

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE PHARMACIE

LES
SYSTÈMES PHOSPHATASIQUES
DE LA CAPSULE SURRÉNALE

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Pharmacie de Montpellier
le 9 Juin 1944

par

BESSELES Henri-Jean-Louis

Pharmacien

Licencié ès Sciences

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Montpellier

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

JURY

MM. ASTRUC, Doyen	<i>Président</i>
CANALS, Professeur	} <i>Assesseurs</i>
GRANGER, Chargé de Cours	

J. PEYRONNET ET Cie, ÉDITEURS
33, Rue Vivienne, Paris-2°

1944

41°308
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE PHARMACIE

LES SYSTÈMES PHOSPHATASIQUES DE LA CAPSULE SURRÉNALE

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Pharmacie de Montpellier
le 9 Juin 1944

par

BESSELES Henri-Jean-Louis

Pharmacien

Licencié des Sciences

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Montpellier

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

JURY

MM. ASTRUC, Doyen	Président
CANALS, Professeur	} Assesseurs
GRANGER, Chargé de Cours	

J. PEYRONNET ET Cie, ÉDITEURS
33, Rue Vivienne, Paris-2°

UNIVERSITEIT DE MONTPELLIER
FACULTÉ DE MÉDECINE

LES
SYSTÈMES PHOSPHATASIQUES
DE LA CAPSULE SURRÉNALE

THÈSE

présentée à l'Université de Montpellier
par le Docteur en Médecine
J. L. L.

BRUNO L. L.



FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

ADMINISTRATION

MM. A. ASTRUC.	Doyen.
E. CANALS.	Assesseur.
TOURETTE.	Secrétaire.

PROFESSEURS

MM. A. ASTRUC.	Pharmacie galénique et pharmacodynamie.
C. HOLLANDE.	Zoologie et Microbiologie.
A. JUILLET.	Botanique et Matière médicale.
E. CANALS.	Physique.
P. JAULMES.	Analyse et toxicologie.
R. DOLIQUE.	Chimie minérale et pharmacie industrielle.
R. GRANGER (chargé de cours).	Chimie organique et chimie biologique.
P. CASTEL (chargé de cours).	Pharmacie chimique.

DOYEN HONORAIRE

M. G. MASSOL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. M. MOUSSERON.	Professeur à la Faculté des Sciences.
A. FAUÇON.	

MAITRE DE CONFERENCES

M. J. GIROUX.	Pharmacodynamie.
---------------	------------------

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

MM. A. JUILLET.	Botanique.
E. CANALS.	Hydrologie.
P. JAULMES.	Toxicologie.
R. DOLIQUE.	Pharmacie industrielle.
R. GRANGER.	Chimie organique.
J. GIROUX.	Physiologie.
J. SUSPUGLAS.	Cryptogamie et Zoologie.
L. ASTRUC.	Législation pharmaceutique.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. L. FARRE.	Chimie et Pharmacie.
J. SUSPUGLAS.	Histoire naturelle.
P. PEYROT.	Chimie.

NOTA. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui sont présentées.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

*Dont la vie sera toujours pour moi le
plus bel exemple.*

A MA MÈRE

*Au dévouement et aux sacrifices de
laquelle je dois tout.*

*Bien faible témoignage de reconnais-
sance et d'affection.*

A TOUS LES MIENS

A MONSIEUR IRISSOU

Pharmacien en Chef des Hôpitaux

*Témoignage de reconnaissance pour
la bonté et la compréhension dont il a
toujours fait preuve à mon égard, pen-
dant le cours de mes trois années d'In-
ternat.*

**A MES CAMARADES DE L'INTERNAT
DES HOPITAUX**

**A MES CAMARADES
DE L'ASSOCIATION CATHOLIQUE DES ÉTUDIANTS**

**A MES CAMARADES DE LA FACULTÉ
EN PARTICULIER A CEUX DE MA PROMOTION**

A MON AMI HENRI SOUCHE

A TOUS MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE DOYEN A. ASTRUC

Professeur de Pharmacie galénique
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'honneur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. CANALS

Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. GRANGER

Agrégé, chargé d'enseignement à la Faculté de Pharmacie

AVANT-PROPOS

Avant de commencer cet exposé, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance à mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie pour leurs enseignements, leurs conseils, et toute la sympathie qu'ils ont eu maintes fois l'occasion de me manifester.

J'adresse tout d'abord mes remerciements respectueux à Monsieur le Doyen ASTRUC dont j'ai pu apprécier, pendant tout le cours de mes études, la bienveillance paternelle et la sollicitude « rouergate », pour le grand honneur qu'il me fait aujourd'hui en présidant ce jury de thèse.

Ma reconnaissance va ensuite à Monsieur le Professeur CANALS dont j'ai eu tant de fois l'occasion d'estimer la grande et sincère bonté, bonté dont il me donne une nouvelle preuve aujourd'hui en me faisant l'honneur de juger ce travail.

C'est à mon Maître, Monsieur le Professeur GRANGER, à ses conseils éclairés, que je dois d'avoir pu mener à bien le travail que je présente aujourd'hui; qu'il veuille trouver ici l'expression de ma grande reconnaissance et de mon indéfectible attachement.

Ma gratitude va également à Monsieur le Professeur MOUSSERON qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire

dès ma troisième année, et qui n'a cessé depuis de me témoigner la plus vive sollicitude.

Qu'il me soit permis de dire à mes camarades du laboratoire de chimie biologique et organique, combien j'ai été sensible à l'amitié et à l'atmosphère de sympathie dont ils m'ont toujours entouré.

INTRODUCTION

Le nombre des composés phosphorés isolés à partir des êtres vivants animaux et végétaux n'a fait que s'accroître au cours de ces dernières années. Ces dérivés interviennent dans la plupart des processus physiologiques essentiels. Ce sont des phosphates minéraux qui, à côté des carbonates et des protéines, maintiennent constant l'équilibre acido-basique de l'organisme. La fermentation alcoolique ne peut avoir lieu en l'absence de phosphates minéraux, car le glucose ne peut subir de dégradations qu'après avoir été transformé en ester phosphorique. La contraction musculaire exige l'intervention de composés phosphorés dont les principaux sont l'acide adénosine triphosphorique et le phosphagène. Ce sont encore des composés phosphorés : les phospho-aminolipides ou phosphatides qui sont chargés d'assurer le transport des graisses au foie et leur utilisation.

L'acide phosphorique rentre encore dans la composition de beaucoup d'autres composés biologiques d'importance vitale tels que les nucléoprotéines avec leurs acides nucléiniques. Enfin, des travaux récents ont montré la présence de l'acide phosphorique dans la constitution de plusieurs coferments. Uni à la vitamine B₁, il forme l'acide aneurine pyrophosphorique, partie cofermentaire de la carboxylase. Dans le ferment jaune

de WARBURG et CHRISTIAN, il est associé à la vitamine B₂ sous forme d'acide lactoflavine phosphorique. Enfin, il entre dans la constitution des codéhydrases ou coferments nicotiniques, où il se trouve uni par l'intermédiaire du ribose à la vitamine PP et à l'adénine. Tous ces coenzymes sont des transporteurs d'hydrogène qui jouent un rôle énorme dans les phénomènes d'oxydo-réduction.

De nombreux composés phosphorés biologiques sont susceptibles de libérer de l'acide phosphorique sous l'action d'un certain nombre de diastases. Ces enzymes, dont on conçoit aisément toute l'importance en biologie, sont les phosphatases.

On a d'abord classé les phosphatases dans le grand groupe des estérases, diastases ayant la propriété d'hydrolyser les esters en leurs constituants : acide et alcool. Mais, par la suite, on a étendu le nom de phosphatases, non seulement à tous les enzymes hydrolysant les esters phosphoriques, mais encore à tous ceux qui ont la propriété de libérer de l'acide phosphorique à partir de corps très divers, qu'ils soient minéraux comme les métaphosphates et les pyrophosphates, ou organiques comme les phospho-amides. Aussi, a-t-on séparé les phosphatases des estérases pour en faire une classe particulière d'enzymes.

Les premières recherches sur ces diastases furent réalisées en 1907 par trois auteurs japonais SUZUKI, YASHIMURA et TAKAISHI (1). Ces biochimistes signalèrent que certaines céréales libéraient de l'acide phosphorique à partir de la phytine. Après eux, d'autres auteurs ont mis en évidence l'existence de phosphatases dans les divers tissus, et ont étudié leur localisation et leur rôle.

(1) SUZUKI, YASHIMURA et TAKAISHI. — *Imp. Univ. Coll. Agrée. Bull. Tokio*, 1907, 7, 503.

Par la suite, les biochimistes ont cherché à purifier ces enzymes et à préciser leur mode d'action et leurs caractères. C'est à ce travail que se sont attachés divers auteurs tels que ROBISON et KAY. Ce dernier, se basant sur les caractères et le mode d'action de ces diastases, en a établi une classification qui est encore admise aujourd'hui.

On a signalé des phosphatases dans presque toutes les cellules vivantes, aussi bien animales que végétales, dans les organismes supérieurs comme dans les organismes inférieurs. L'aorte, les ganglions lymphatiques normaux, les cartilages hyalins et la peau de chien (1) sont les seuls tissus où les phosphatases n'ont pu être décelées.

Mais leur répartition dans les diverses cellules est très inégale. Chez les mammifères, les tissus qui en sont les plus riches sont les os des animaux jeunes, le rein et la muqueuse intestinale. Cette répartition est liée à la participation de ces enzymes à l'ossification, à la production rénale des phosphates et aux phénomènes de phosphorylation qui accompagnent la digestion des oses et des lipides.

Parmi les végétaux, les levures sont particulièrement riches en phosphatases qui vont présider à la fermentation alcoolique. Chez les végétaux supérieurs, ce sont surtout les graines qui possèdent une forte activité phosphatasique; on a signalé l'activité particulière des tubercules de pomme de terre (2). La teneur en phosphatases d'un tissu végétal subit des variations au cours du développement.

D'autre part, l'enzyme est inégalement réparti dans les différentes cellules d'un même organe. Par exemple, dans les reins

(1) FOLLEY (S. J.) et KAY (H. D.). — *Erg. Enzymforsch.*, 1936, 5, 159.

(2) PFANKUCH (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, 241, 34.

de mammifères, la partie médullaire renferme très peu de phosphatase, la zone corticale en contient beaucoup et les glomérules presque pas. Les os longs des enfants renferment beaucoup de phosphatase dans les zones de calcification et dans les cartilages hypertrophiques, moins dans le tissu spongieux métaphysaire, et pas du tout dans le cartilage hyalin (1).

Bien que les travaux dans le domaine phosphatasique aient été nombreux et riches en résultats, des organes animaux importants n'ont pas encore été l'objet de recherches très approfondies. Il en est ainsi de la capsule surrénale, double glande à sécrétion interne dont on connaît à présent l'intervention puissante dans les métabolismes. C'est pour cette raison que Monsieur le Professeur GRANGER nous a vivement engagé à en réaliser l'étude, afin de comparer les phénomènes diastasiques de cet organe aux nombreux systèmes phosphatasiques particulièrement bien décrits ces dernières années par Monsieur le Professeur ROCHE et ses élèves.

Le plan de nos recherches est le suivant :

Chapitre I. — Notions générales sur les phosphatases.

Chapitre II. — Techniques générales.

Chapitre III. — Le système phosphomonoestérasique.

I. Etude de l'organe frais.

II. Etude de la poudre acétonique.

III. Les vitesses de réaction de la phosphatase A_1 .

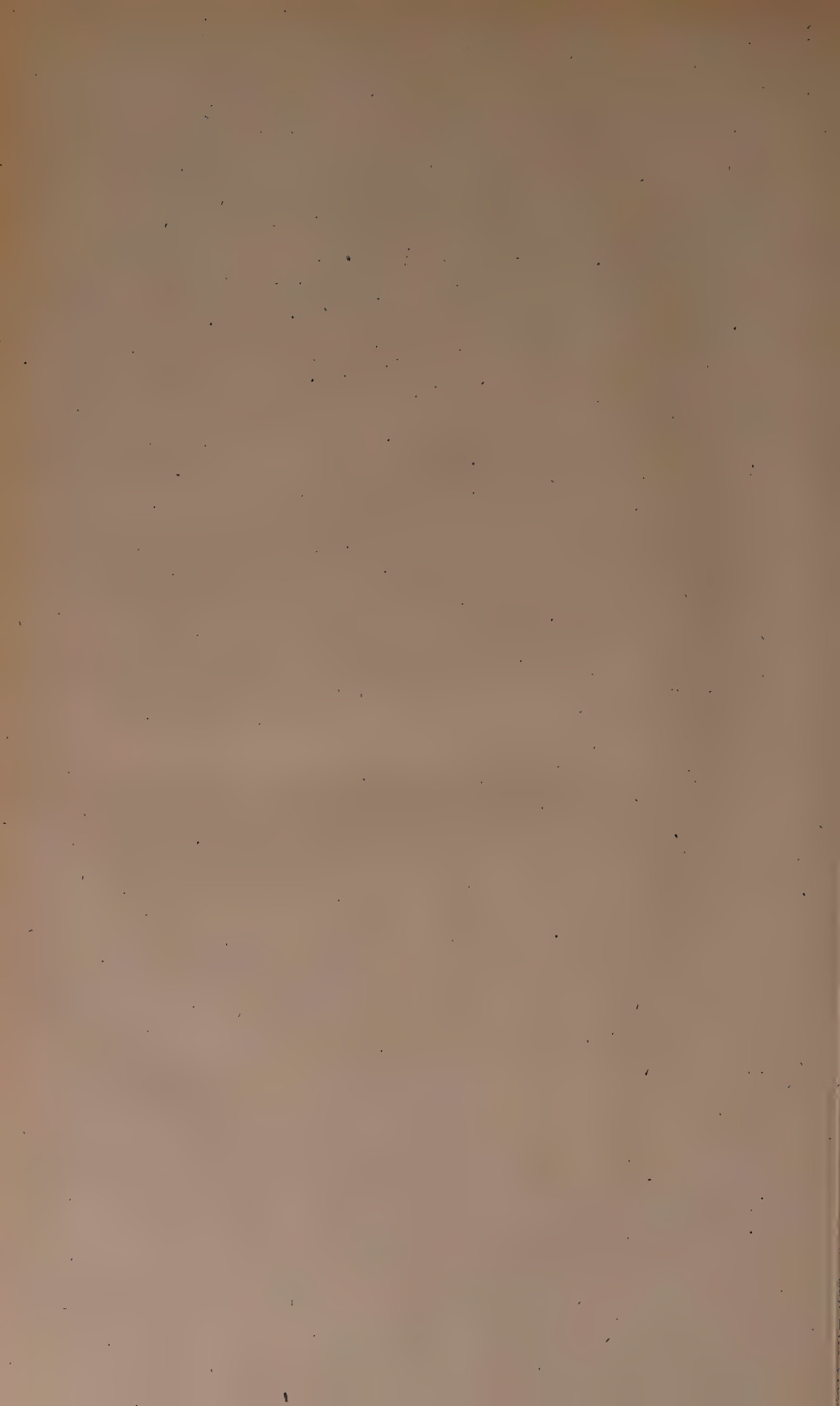
IV. Les effecteurs.

(1) POLICARD, PEHU, ROCHE et BOUCOMONT. — *Bull. Histol.*, 1931, 8, 171.

Chapitre IV. — Les autres systèmes phosphatasiques.

- I. Les pyrophosphatases.
- II. Les phosphodiesterases.
- III. Les métaphosphatases.
- IV. Les phytinases.

Résumé.



CHAPITRE PREMIER

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LES PHOSPHATASES

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, il paraît nécessaire de donner quelques notions générales sur la question des phosphatases, notions concernant leur classification, leur extraction et leur purification, leur constitution, et enfin leurs activateurs et inhibiteurs (1).

I. — CLASSIFICATION

L'universalité des phosphatases a conduit les biochimistes à rechercher si ces enzymes possèdent une activité identique sur différents substrats — différents esters phosphoriques — quelle que soit leur origine. Les résultats obtenus ont permis de constater qu'il n'existe pas une phosphatase mais des phosphatases, en nombre relativement élevé.

C'est en se basant sur leur spécificité vis-à-vis de divers substrats, que FOLLEY et KAY (2) ont pu établir une classification

(1) La plupart des renseignements de notre bibliographie ont été relevés à partir des thèses de COURTOIS (J.), BAUDOIN (J.), LAURENS (A.), de LAROMIGUIÈRE (S.) et DURAND (J.).

(2) KAY (H. D.). — *Physiol. Rev.*, 1932, 12, 384.

basée sur la nature des corps qu'elles hydrolysent. Ces enzymes ont été répartis en six groupes :

1°) *Les phosphomonoestérases* qui hydrolysent tous les monoesters de $\text{PO}_4 \text{H}_3$.

2°) *Les phosphodiastérases* qui sont actives sur les diesters de $\text{PO}_4 \text{H}_3$, mais n'attaquent qu'une seule liaison du diester.

3°) *Les pyrophosphatases* qui libèrent $\text{PO}_4 \text{H}_3$ soit à partir des pyrophosphates métalliques, soit à partir des esters pyrophosphoriques.

4°) *Les métaphosphatases* qui hydratent les sels de l'acide métaphosphorique.

5°) *Les phosphoamidases* qui dédoublent les amides phosphoriques en $\text{PO}_4 \text{H}_3$ et une base azotée.

6°) Enfin le dernier groupe renferme les phosphatases spécifiques d'un seul substrat. Il comprend : la lécithinase, la phytinase, l'adényl pyrophosphatase, l'hexose diphosphatase.

Nous allons étudier successivement chacun de ces groupes.

Les Phosphomonoestérases. — Les phosphomonoestérases semblent susceptibles d'hydrolyser toute une gamme d'esters phosphoriques d'alcools ou de phénols. Ces phosphatases peuvent en effet hydrolyser les esters phosphoriques (1) d'alcools aliphatiques : $\text{CH}_3 \text{OH}$, $\text{C}_2 \text{H}_5 \text{OH}$, de polyols et d'oses (glycérine, glucose), d'alcools cyclaniques (cyclohexanol), d'alcools terpéniques (cholestérol, bornéol, fenchol), de phénols (phénol, naphthol). La phosphatase possède des réactivités différentes vis-à-vis de stéréoisomères; l'hydrolyse des esters racé-

(1) UZAWA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, 15, 1, 11 et 19.

miques du bornéol et du fenchol libère principalement des alcools lévogyres (1).

FOLLEY et KAY distinguent quatre types de phosphomonoestérases en se basant sur leur pH optimum d'action, leur aptitude à dédoubler préférentiellement l'un des isomères α ou β de l'acide glycéro-phosphorique et leur sensibilité vis-à-vis de l'ion Mg^{++} . On donne à ces phosphatases, qui ont la propriété d'hydrolyser les mêmes esters phosphoriques, le nom d'isodynâmes, terme mal choisi qui fait plutôt penser à une égalité de force qu'à une spécificité de substrat.

Le type A₁ ou phosphatase alcaline. — C'est la plus répandue dans le règne animal. Elle est caractérisée par un pH optimum d'action voisin de 9,0 et une activité plus grande sur les β que sur les α glycérophosphates. Elle est activée par l'ion Mg^{++} . Elle est très répandue dans tous les tissus de mammifères : muqueuse digestive, rein, foie, poumon, glande mammaire, os, rate. On la retrouve chez certaines bactéries et champignons inférieurs (2) mais elle n'a jamais été signalée chez les végétaux supérieurs. Selon HOTTA et JACOBSON (3), elle hydrolyse tous les monoesters phosphoriques à l'exception de ceux des alcools hydroaromatiques ou secondaires. L'étude de cette phosphatase a été très approfondie grâce aux travaux de ROBISON, de KAY et de nombreux auteurs (4-5-6). Néanmoins, cette diastase n'a jamais pu être isolée à l'état pur.

(1) NEUBERG (C.), WAGNER (J.) et JACOBSON (K. P.). — *Biochem. Z.*, 1927, 188, 227.

(2) PETT (L. B.) et WYNNE (A. M.). — *Biochem. J.*, 1933, 27, 1660.
SCHUCHARDT (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, 283, 433.

(3) UDAGAWA. Cité d'après R. HOTTA. — *J. Biochem. Japan*, 1934, 20, 343.
JACOBSON (K. P.). — *Biochem. Z.*, 1931, 230, 207.

(4) LATREILLE (M.). — *Thèse doct. Pharm.*, Marseille, 1938.

(5) BESSE DE LAROMIGUIÈRE (S.). — *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1942.

(6) LAURENS (A.). — *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1942.

Le type A_2 ou phosphatase acide. — Caractérisée par un pH optimum compris entre 5 et 6, elle fut mise en évidence par ROBISON et SOAMES (1). Elle est insensible à l'ion Mg^{++} et elle dédouble préférentiellement l' α glycérophosphate de Na. Elle a été signalée dans le foie et la rate (2), dans divers organes des végétaux supérieurs (3), dans les champignons (4) et dans le son de riz (5).

Le type A_3 ou phosphatase très acide. — De pH optimum compris entre 3 et 4, elle est inhibée par l'ion Mg^{++} . Son comportement vis-à-vis des glycérophosphates est variable. Elle est surtout signalée chez les végétaux; on la trouve dans la takediastase de l'*Aspergillus oryzae* (6), et dans les champignons (4). Mais on en rencontre également dans les organes animaux : le rein (7), le foie et la rate (8-9).

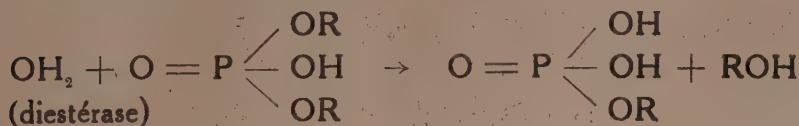
Enfin le type A_4 . — Phosphatase de pH optimum compris entre 6 et 6,4, elle est activée par l'ion Mg^{++} . Elle dédouble plus rapidement l' α que le β glycérophosphate. Elle a été décrite d'abord dans les hématies par ROBISON et MARTLAND et par ROCHE (10-11). SCHAFFNER et BAUER l'ont retrouvée dans la levure basse (12) et elle fut étudiée dans les hématies par ROCHE et BULLINGER (13).

Mais cette classification des phosphomonoestérases ne peut

-
- (1) ROBISON et SOAMES. — *Biochem. J.*, 1924, 18, 740.
 - (2) DAVIES (R. D.). — *Biochem. J.*, 1934, 28, 528.
 - (3) COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, n° spécial, 1934, p. 388.
 - (4) NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, 23, 1183.
 - (5) UZAWA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, 15, 1.
 - (6) AKAMATSU. — *Biochem. Z.*, 1923, 142, 184.
 - (7) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.
 - (8) OHMORI (Y.). — *Enzymologia*, 1937, 4, 217.
 - (9) BAMANN (E.) et SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, 286, 147.
 - (10) MARTLAND, HANSMAN et ROBISON. — *Biochem. J.*, 1924, 18, 1152.
 - (11) ROCHE (J.). — *Biochem. J.*, 1931, 25, 1724.
 - (12) SCHAFFNER et BAUER. — *Z. Physiol. chem.*, 195, 232, 66.
 - (13) ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — *Enzymologia*, 1939, 7, 278.

être considérée que comme approchée. En effet, le pH optimum de ces enzymes varie : ainsi celui de la phosphatase très acide dépend du taux des inhibiteurs naturels accompagnant l'enzyme (1-2) ; il est compris entre pH 3,2 et pH 4,4. De plus, l'ion Mg^{++} peut se comporter comme activateur ou comme inhibiteur de la même phosphatase, suivant l'organe dans lequel on la rencontre. Ainsi, l'enzyme A_2 de pH optimum 5-5,6 qui est en général inhibé par l'ion Mg^{++} (3-4-5) peut être activé par lui (6-7) ou être insensible à sa présence (8-9). Enfin, l'action préférentielle sur l'un des glycérophosphates de Na ne paraît pas constituer un caractère absolu des diverses phosphatases. L'enzyme A_2 hydrolyse plus énergiquement l'isomère β que l' α dans les organes animaux, tandis que, dans les feuilles d'aman-dier, c'est l'isomère α qui est plus facilement dédoublé.

Les Phosphodiesterases. — On a montré que l'hydrolyse d'un diester de l'acide phosphorique exigeait l'intervention de deux enzymes. Le premier (diesterase) va libérer un monoester phosphorique et un alcool. Le deuxième (monoesterase) va agir sur le monoester formé pour donner un alcool et une molécule d'acide phosphorique.



-
- (1) KOBAYASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, 8, 205.
 - (2) INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, 7, 433.
 - (3) COURTOIS (J.). — *Thèse Sciences*, Paris, 1938.
 - (4) DAVIES (R. D.). — *Biochem. J.*, 1934, 28, 528.
 - (5) NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, 23, 1183.
 - (6) KNAENEVAGEL (C.). — *Biochem. Z.*, 1940, 305, 337.
 - (7) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, 8, 205.
 - (8) GIRI (K. V.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, 245, 185.
 - (9) CEDRANGOLO (F.). — *Bull. Soc. Ital. Biol. speriment.*, 1935, 10, 374.



L'action des diestérases est très difficile à étudier, car ces diastases coexistent dans les organes avec les monoestérases. UZAWA (1) a cherché vainement à obtenir, par des méthodes d'adsorption spécifique, une diestérase dépourvue de monoestérase; mais il trouva des venins de serpent qui contenaient une diestérase de pH optimum 8,6, et pas de monoestérase. HOTTA (2) étudiant la libération de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ à partir des diesters par les extraits de rein, a obtenu deux pH optimums 5 et 7,8. Enfin, pour UDAGAWA (3), il y a deux espèces de diestérases dans les organes animaux : l'une a un pH optimum à 9 comme celle des venins de serpent, l'autre a son optimum vers 5 ou 6.

Les Pyrophosphatases — Pour établir une classification de ces enzymes, on envisage seulement leur pH optimum d'action. Pour TAKAHASHI et MUNEMURA (4-5) il y aurait 3 pyrophosphatases de pH optimum respectif : 3,8 - 4, 5,2 - 5,5 et 8. Les deux premières existent à la fois dans les tissus végétaux (6-7) et animaux (8). Seule la dernière (pH : 8) paraît n'exister que chez les animaux où sa répartition est liée à celle de la phosphatase A_1 . Toutefois BAUER a décrit une

(1) USAWA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, 15, 11.

(2) HOTTA. — *J. Biochem. Japan*, 1934, 20, 343.

(3) UDAGAWA. — *J. Biochem. Japan*, 1935, 22, 2.

(4) TAKAHASHI. — *J. Biochem. Japan*, 1932, 16, 447.

(5) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

(6) COURTOIS (J.). — *Thèse Sciences*, Paris, 1938.

(7) NGUYEN VAN THOAI. — *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 1941, 23, 1277.

(8) BAMANN (E.) et GALL (H.). — *Biochem. Z.*, 1937, 293, 1.

pyrophosphatase de pH optimum 6,4 dans les levures. Tous les organes animaux paraissent renfermer les trois pyrophosphatases signalées par TAKAHASHI et MUNEMURA, mais la présence de ces trois enzymes n'apparaît pas toujours sur les préparations brutes. On peut toutefois les mettre en évidence soit en faisant varier les conditions d'extraction, soit en faisant intervenir des actions activatrices (1).

Les Métaphosphatases. — Elles furent découvertes par KITASATO (2) dans la levure puis dans les extraits de foie et de rein. Ces diastases possèdent la propriété d'hydrater le métaphosphate pour donner de l'orthophosphate.



Signalons au passage que la métaphosphatase est le seul enzyme capable d'agir sur des substrats inorganiques n'existant pas dans les cellules.

Les Phosphoamidases. — L'hydrolyse des amides phosphoriques, tels que la phosphoarginine, la phosphocréatine, semble due à des enzymes spécifiques. ICHIHARA (3) a pu séparer par adsorption la phosphoamidase de la phosphomono-estérase dans les extraits de rein.

(1) DURAND (J.). — *Thèse doct. Pharm.*, Marseille, 1943.

(2) KITASATO. — *Biochem. Z.*, 1928, 197, 257.

(3) ICHIHARA. — *J. Biochem. Japan*, 1933, 18, 87.

II. — EXTRACTION ET PURIFICATION

Les phosphatases existant dans les tissus animaux ou végétaux doivent être extraites de ces tissus.

Cette opération ne présente en général aucune difficulté; mais elle n'est jamais quantitative. Une certaine fraction de la diastase reste souvent fixée aux éléments protoplasmiques insolubles et, pour l'extraire, on est obligé d'avoir recours à une autolyse du protoplasme. La partie diastasique qui passe en solution avec facilité a reçu le nom de lyoenzyme; on donne le nom de desmoenzyme à l'autre fraction.

Les phosphatases sont extraites par l'eau ou par des solutions tampons des tissus animaux ou végétaux préalablement broyés. Le rendement varie avec le pH du liquide utilisé. Lorsque la macération est de longue durée, on empêche le développement microbien par l'addition d'antiseptiques. On pourra étudier les phosphatases dans ces extraits bruts sans purification préalable. Cette étude fournira un certain nombre de données très intéressantes, mais incomplètes; en effet ces extraits sont des milieux complexes renfermant, à côté de la diastase, des activateurs ou des inhibiteurs susceptibles de modifier son activité.

Les différents moyens proposés par les auteurs pour purifier les phosphatases sont basés sur deux principes généraux : l'un consiste à éliminer les impuretés du milieu naturel (1), l'autre a pour but d'extraire isolément l'enzyme du milieu.

Les impuretés les plus abondantes sont les protéines, on a donc cherché à les éliminer. Mais si on les précipite, les phosphatases facilement adsorbables sont entraînées. Ce procédé,

(1) AZAKAWA (K.), — *J. Biochem. Japan*, 1928, 10, 157.

qui n'est pas applicable aux extraits riches en protéines, a permis d'obtenir, à partir de préparations plus pauvres en ces éléments, des solutions enzymatiques douées d'une assez grande activité. En additionnant de petites quantités d'alcool et d'éther (1) à l'extrait aqueux d'organe, une partie des protéines va précipiter entraînant avec elle la diastase. Le précipité obtenu est séché, puis remis à macérer dans de l'eau qui libère l'enzyme; les protéines ayant été dénaturées par l'alcool ne passent pas en solution.

Mais, pour obtenir une phosphatase aussi pure que possible, il vaut mieux utiliser les méthodes basées sur le deuxième principe : il s'agit d'extraire du milieu l'enzyme par adsorption spécifique. On utilise comme adsorbant soit du kaolin, soit de l'alumine, et on opère à divers pH suivant le type de l'enzyme à étudier. Cette phosphatase, une fois adsorbée, est remise en élution dans une solution à un pH approprié.

Cette méthode, utilisée surtout par des auteurs japonais, présente l'avantage de fournir des solutions enzymatiques beaucoup moins complexes que les extraits d'organe. Elle offre un grand intérêt dans la caractérisation des phosphatases, car certains de ces ferments présentent, après extraction par adsorption, un pH optimum d'action très différent du pH précédemment noté dans la préparation brute. Ainsi, la Takadiastase de l'*Aspergillus orizae* contient une phosphatase dont le pH optimum d'action est de 5,6 dans l'extrait brut, mais qui est de 3 après adsorption sur kaolin à pH 4 et élution à pH 5,6. Ce fait montre qu'il doit exister dans les macérations brutes des corps qui modifient l'activité de la diastase.

Ce procédé d'extraction, par adsorption et élution, ne per-

(1) MARTLAND et ROBISON. — *Biochem. J.*, 1929, 23, 237.

met pas d'obtenir des préparations très actives. Pour atteindre ce but, on emploie les méthodes où une autolyse suffisante permet une libération presque totale de l'enzyme. Le type de ces méthodes est celle préconisée par ALBERS (H.) et ALBERS (E.) (1). Ces auteurs opèrent l'autolyse du rein en présence d'acétate d'éthyle, d'alcool et de toluène. Au bout de trois jours, ils filtrent la macération et ils précipitent l'enzyme et les protéines solubles par addition d'alcool à 80 %. Dans les autolysats en milieu alcoolique il y a destruction des protéines mais la phosphatase n'est pas atteinte. Le précipité obtenu par l'addition d'alcool est lavé et séché. C'est cette poudre sèche que l'on fait macérer dans l'eau : les protéines dénaturées ne passent pas en solution, alors que la plus grande partie des phosphatases se retrouve dans l'extrait aqueux.

C'est un procédé analogue mais plus simple que nous avons utilisé. Les organes broyés subissent l'autolyse en milieu acétonique : l'acétone dénature les protéines et laisse les phosphatases intactes. Le produit obtenu est séché au vide, et par macération dans l'eau il libérera ses enzymes.

III. — CONSTITUTION DES PHOSPHATASES

On sait depuis les travaux de G. BERTRAND et de WILLS-TATTER que les diastases sont formées par l'union de deux constituants. L'un, le coenzyme, de nature relativement simple, est porteur de groupements actifs catalysant spécifiquement une réaction : c'est ainsi que divers enzymes oxydants contiennent un coenzyme dans lequel est présent un métal pouvant exister sous forme oxydée ou sous forme réduite. L'autre

(1) ALBERS (H.) et ALBERS (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, 232, 189.

constituant ou apoenzymie est toujours une protéine également spécifique; il participe à la fixation du substrat, et c'est sur les modifications de son affinité que repose l'action de certains inhibiteurs. L'union du coenzyme et de l'apoenzyme donne naissance à l'holoenzyme. Cet holoenzyme a pu être parfois isolé à l'état de pureté, mais jusqu'ici ce n'est le cas pour aucune phosphatase.

ALBERS a poursuivi des recherches sur la constitution de ces diastases (1). L'holophosphatase est formée par une réaction d'équilibre entre la cophosphatase de faible poids moléculaire, groupement actif ou porteur de groupements actifs, et l'apophosphatase, protéine spécifique de poids moléculaire élevé :



La spécificité d'action de ces diastases vis-à-vis d'une liaison (ester par exemple) est liée au groupement actif contenu dans le coferment, tandis que leur action sélective envers le substrat dépend des différents apoferments. Chez les phosphatases, le pH optimum est une caractéristique qui marche de pair avec la spécificité du substrat. La diversité des pH optimaux des phosphatases est liée à la diversité des apoferments, et il semble qu'on puisse parler « d'apoferment spécifique ». Les ferments provenant de différents organes d'un même animal peuvent être très semblables, mais les petites variations qu'ils peuvent présenter doivent être attribuées à des différences de spécificité dans les apoferments.

S'il existe dans un organe, à côté d'une holophosphatase

(1) ALBERS (H.), BEYER (E.), BOHNEMKAMP (A.) und MÜLLER (G.). — *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 1938, **71**, 1913.

spécifique agissant à pH bien déterminé, l'apoferment d'une autre phosphatase, cette dernière n'apparaît pas, puisqu'il lui manque son coenzyme. Mais, si les conditions permettent un dédoublement de l'holophosphatase, le coferment libéré peut se combiner au deuxième apoferment et ainsi la deuxième holophosphatase apparaîtra.

Ces déplacements de cophosphatases se constatent en fait, et ALBERS (1) qui les a étudiés a pu en tirer des conclusions très importantes pour l'étude des phosphatases et des autres ferments. En mélangeant à pH 9 l'apophosphatase rénale (dérivée de la phosphatase A_1 du rein), avec la phosphatase de la levure basse (pH optimum 4, inactive à pH 9), il obtient une activité qui augmente avec le temps. C'est donc que le coferment s'est déplacé de l'apophosphatase de la levure basse sur l'apoferment du rein. Mais l'activité qu'il obtient n'atteint jamais ni celle de la phosphatase du rein, ni celle de la phosphatase acide, à leur optimum. Ce fait peut s'expliquer par une destruction partielle de l'apoenzyme au cours des opérations. Si maintenant on mélange à de l'apophosphatase acide le coferment de la phosphatase rénale, on obtient le même phénomène.

On a pu établir des courbes de stabilité des phosphatases en fonction du pH; ces courbes sont différentes des courbes d'activité et dépendent de la réaction de dissociation :

Coferment + apoferment $\rightleftharpoons$ holoferment ;

la réaction fonctionnant dans un sens ou dans l'autre suivant le pH. Ces courbes montrent par exemple que la phosphatase alcaline s'inactive rapidement entre pH 6 à 5, et la phosphatase

(1) ALBERS (H.), BEYER (E.), BOHNEMKAMP (A.) und MULLER (G.). — *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1938, 71, 1913.

tase acide (pH optimum 4) entre pH 8 et 6, et entre pH 3,2 et 1,5. D'autre part, dans la zone d'inactivation rapide, la dissociation de la phosphatase est possible, alors qu'elle est très difficile dans la zone de stabilité. Ainsi, la phosphatase de la levure placée aux pH alcalins, en présence d'apophosphatase rénale, perd un coferment qui va s'unir à l'apophosphatase rénale. Inversement, la phosphatase rénale maintenue à pH 5 ou 6, va céder son coferment à l'apoenzyme de la levure.

Ceci montre que deux phosphatases d'origine très différente (règne animal ou règne végétal), possèdent le même coenzyme et il n'est pas impossible que toutes les phosphatases de même spécificité possèdent le même coferment. Ce déplacement du coferment, d'un apoenzyme sur l'autre, rend très difficiles les méthodes de préparation à l'état pur de ces enzymes, surtout lorsqu'on se trouve en présence de phosphatases isodynames.

En dialysant une solution phosphatasique à un pH déterminé, on peut dédoubler l'holoenzyme en coferment qui dialyse, et en apodiastase qui reste dans le dialysat (protéine). D. ALBERS (1) a montré que l'on trouvait dans le liquide dialysé l'ion Mg^{++} ainsi qu'une autre substance qui est le coferment. L'addition d'ions Mg^{++} à l'apodiastase ne fait pas réapparaître d'activité; alors que, si l'on rajoute le liquide dialysé au dialysat, l'activité phosphatasique reparaît.

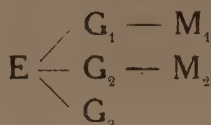
CLOETENS poursuivant les travaux d'ALBERS, montre qu'à la partie protéique E de l'enzyme sont liés deux groupements G_1 et G_2 qui peuvent se combiner à deux ions métalliques M_1 et M_2 (2). De plus, il existerait un troisième groupement G_3 (3) différent de G_1 et G_2 , et qui serait libre. Mais G_3 serait suscep-

(1) ALBERS (D.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1939, 261, 43.

(2) CLOETENS (R.). — *Biochem. Z.*, 1941, 307, 352.

(3) CLOETENS (R.). — *Biochem. Z.*, 1941, 308, 37.

tible d'être bloqué par un métal, ce qui amènerait une perte d'activité. On peut schématiquement représenter la phosphatase ainsi :



Par dialyse contre une solution de $\text{CO}_3 \text{ H Na}$, on détache M_1 et l'activité de la diastase diminue considérablement. Par dialyse contre une solution de KCN , on détache M_2 . M_1 peut être Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} ; M_2 peut être Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Hg^{++} . Lorsque M_2 est absent, M_1 peut se fixer sur G_2 . L'inhibition de la diastase peut être réalisée soit par un métal qui se fixe sur G_3 , soit par un corps susceptible de former des complexes avec M_1 ou M_2 .

Tel est le cas des fluorures étudiés par MASSART et DUFAYT (1). Pour ces auteurs, l'ion F^- agirait par formation de complexes avec les métaux de l'enzyme qui peuvent être soit trivalents comme Fe^{+++} et Mn^{+++} , soit divalents tel Mg^{++} . Le fluorure de sodium, tout en restant inhibiteur donne des résultats variables : ceci est dû à la présence comme métal M_1 soit de Mg^{++} , soit de Co^{++} , soit d'un autre métal. L'ion F^- , s'unissant plus facilement au magnésium qu'aux autres métaux, inhibera beaucoup plus les phosphatases renfermant du magnésium dans leur constitution que celles renfermant du cobalt ou du manganèse. Le cyanure de potassium, formant un complexe avec le cobalt, inhibera plus facilement les phosphatases à cobalt. D'après cette hypothèse, la phosphatase alcaline du foie serait une diastase à magnésium.

(1) MASSART (L.) et DUFAYT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, 272, 157.

La classification des phosphomonoestérases de FOLLEY et KAY en quatre types (1) doit être maintenue (ALBERS), car elle repose sans doute sur des différences d'apofériments.

IV. — LES EFFECTEURS

Dans les cellules toutes les réactions sont catalysées par des diastases, mais l'activité de ces diastases est susceptible d'être augmentée ou diminuée par des substances existant dans ces cellules. Ces substances sont appelées : activateurs et inhibiteurs, ou, d'un terme plus général, effecteurs.

Certains produits chimiques, qui n'existent pas dans les organismes, possèdent les mêmes propriétés. Nous allons passer en revue rapidement les principaux des effecteurs, après quoi, nous donnerons quelques explications sur leur mode d'action.

L'Ion Mg^{++} . — Le principal des effecteurs n'est autre que l'ion Mg^{++} déjà signalé au cours de la classification des phosphomonoestérases. Nous savons en effet que c'est en partie sur l'action activatrice ou inhibitrice de l'ion Mg^{++} qu'est basée la différenciation des phosphomonoestérases en quatre types. L'ion Mg^{++} a la propriété d'activer la phosphomonoestérase A_1 (pH optimum 9) ainsi que la diastase A_4 des hématies (pH 6,4). Par contre il inhibe la phosphomonoestérase A_3 (pH 3-4) et il est sans action sur A_2 (pH 5-6). Son action sur les pyrophosphatases n'est pas encore très bien établie; il semble toutefois que l'ion Mg^{++} ait un effet activateur sur les trois pyrophosphatases.

(1) ALBERS (H.). — *Die Phosphatasen in Handbuch der Enzymologie*, 2 vol., 1545 p., Akdd. Verl. Leipzig, 1940.

C'est ERDTMANN (1) qui découvrit en 1927 l'action activateur du magnésium sur la phosphomonoestérase rénale. Cette action fut étudiée par JENNER et KAY (2), qui constatèrent qu'il existe une concentration optima en cet ion, pour laquelle l'activation est maxima. On chercha alors à déterminer pour chaque phosphatase cette concentration optima et on calcula $q \text{ Mg}$, soit le logarithme de l'inverse de la concentration moléculaire en ions Mg^{++} ; $q \text{ Mg} = \log \frac{1}{[\text{Mg}^{++}]}$

Il importe de remarquer que l'on fait intervenir ici la molarité et non la normalité. Cette expression a été choisie pour son grand intérêt pratique, car elle permet d'éviter les rapports à dénominateur élevé.

L'activation par l'ion Mg^{++} n'est pas identique quantitativement dans tous les organes et, pour chacun d'eux, elle varie suivant les conditions d'extraction. BAMANN, RIEDEL et DIEDERICHS (3) ont montré que les produits d'extractions aqueuses successives de rein ou de foie deviennent de moins en moins activables par le magnésium; en d'autres termes les lyoenzymes paraissent plus fortement activés que les desmoenzymes.

Les autres Métaux. — A côté du magnésium, on a étudié l'action de différents métaux sur l'activité phosphatasique des organes.

(1) ERDTMANN. — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, 172, 182.

(2) JENNER (H. D.) and KAY (H. D.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, 93, 733.

(3) BAMANN (E.), RIEDEL (E.) et DIEDERICHS (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, 230, 175.

C'est d'abord le manganèse, qui pour CLOETENS (1), MASSART et DUFAIT (2), BAMANN (3) possède une action activatrice sur la phosphomonoestérase A_1 . Pour CLOETENS, cette action est telle que le manganèse doit être considéré comme un constituant de l'enzyme. Pour BAMANN, l'ion Mn^{++} serait un activateur plus puissant que l'ion Mg^{++} .

A côté du manganèse, le fer, le nickel, le cobalt peuvent avoir une action activatrice sur A_1 mais beaucoup plus faible (4).

Le zinc paraît être activateur de la pyrophosphatase alcaline (5). HOVE, ELVEHJEM et HART (6) indiquent que le zinc et les acides aminés peuvent exercer une action activatrice couplée sur la phosphatase A_1 de l'intestin. Une préparation de muqueuse intestinale dialysée est inhibée par l'ion Zn^{++} , elle est peu activée par de l'alanine, mais elle l'est fortement par le couple Zn^{++} -alanine. Pour CLOETENS, le zinc serait un constituant de la phosphatase du sérum.

L'action du calcium est probablement nulle (7-8).

Les Anions. — L'ion PO_4 est un inhibiteur général des phosphatases. Son importance aussi bien physiologique qu'ex-

(1) CLOETENS (R.). — *Naturw.*, 1939, 27, 806; 1940, 1, 392.

(2) MASSART (L.) et DUFAIT (R.). — *Naturw.*, 1939, 27, 806; 1940, 1, 393.

(3) BAMANN (E.). — *Naturw.*, 1940, 82, 142 et *ibid.* 3405.

(4) MASSART (L.) et VANDENDRIESSCHE (L.). — *Naturw.*, 1940, 28, 143; c. c. 1940, 1, 3405.

(5) HORII. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Suppl. Lief* 1 et 2. X. Junk, éd., La Haye, 1935, 98, 170.

(6) HOVE (E.), ELVEHJEM (C. A.) and HART (E. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, 134, 425.

(7) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

(8) BAMANN (E.), RIEDEL (E.) et DIEDERICH (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, 230, 175.

périmentale est évidente, car l'apparition d'ions PO_4 au cours de l'hydrolyse enzymatique ralentit celle-ci.

L'ion AsO_4 exerce également une action inhibitrice. Celle-ci fut mise en lumière par ERDTMANN (1) et MUNEMURA (2) sur la phosphatase rénale et par KLEIN et ROSSI (3) sur la phosphatase intestinale. MUNEMURA (2) a retrouvé cette action sur la pyrophosphatase alcaline.

INOUE (4) a mis en évidence l'effet inhibiteur des fluorures alcalins sur les phosphatases acides. La phosphatase alcaline du cerveau (5) et celle des hématies (6) sont inhibées par les fluorures, alors que celle du rein et celle du sérum ne le sont pas (7-2). La pyrophosphatase alcaline serait insensible (2) aux fluorures.

Les oxalates alcalins sont des inhibiteurs généraux et plus forts des phosphatases alcalines que les fluorures. Leur action fut constatée par MUNEMURA (2) sur la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase rénale.

CLOETENS a démontré l'action inhibitrice des cyanures alcalins sur le phosphatase A_1 , action fortement diminuée par l'ion Mg^{++} . Cette action a été confirmée par MASSART et DUFAYT (8).

Les Effecteurs organiques. — L'acide ascorbique exerce une action incertaine sur les diverses phosphatases. Pour

(1) ERDTMANN (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, 172, 182; 1928, 177, 211.

(2) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

(3) KLEIN (W.) et ROSSI (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, 231, 104.

(4) INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, 7, 433.

(5) CEDRANGOLO (F.). — *Boll. Sc. Ital. Biol. Sperim.*, 1935, 10, 374.

(6) ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — *Enzymologia*, 1939, 7, 278.

(7) BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) et ENCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, 29, 842.

(8) MASSART (L.) et DUFAYT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, 272, 157.

EULER et SVENSON (1) la vitamine C inhibe l'enzyme A_1 de l'intestin et active la phosphorylation du glucose par la levure de bière; mais ce dernier fait peut provenir d'une modification du pH par la vitamine C. ALBERS n'a pas noté d'action de l'acide ascorbique sur la phosphatase A_1 du rein.

Les acides aminés présentent une certaine concentration pour laquelle ils sont activateurs; au delà ils deviennent inhibiteurs (2).

L'action des acides biliaires est discutée. D'après BODANSKY (3) ils seraient inhibiteurs de la phosphatase alcaline de l'os et du rein, et non de celle de l'intestin.

Les thiols (cystéine-glutathion) sont fortement inhibiteurs de la phosphomonoestérase alcaline dans tous les organes, les dérivés disulfurés correspondant l'étant beaucoup moins ou sans action à des concentrations où les premiers exercent un effet défavorable marqué. Les pyrophosphatases sont moins sensibles à la présence de thiols et ceux-ci ne provoquent d'inhibition très nette que sur l'enzyme intestinal (4).

Enfin, on a signalé l'effet inhibiteur sur les phosphatases de quelques glucosides (phlorhidzocide) (5) et de quelques alcaloïdes (quinine, morphine, codéïne).

Mode d'action des Effecteurs. — Il est difficile d'expliquer le mode d'action des effecteurs, tant qu'on ne connaît pas la constitution exacte de la phosphatase, et la nature de

(1) EULER et SVENSON. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.) : Supp., Lief 1 et 2, W. Junk, éd., La Haye, 1935, 98, 170.

(2) HOVE (E.), ELVEHJEM (C. A.) et HART (E. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, 134, 425.

(3) BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, 118, 341.

(4) LAURENS (A.). — *Thèse Doct. Pharmacie*, Marseille, 1942.

(5) LUNDSGAARD. — Cité par COURTOIS et RABATTE : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, 23, 184.

ses groupements, se combinant au substrat et aux produits de son dédoublement. L'action des activateurs et des inhibiteurs peut s'exercer sur le coenzyme ou sur l'apoenzyme. On appelle effecteurs « absolus » ceux qui agissent indépendamment de la concentration en substrat dans le milieu, et l'on admet qu'ils se combinent au coferment dont ils augmentent ou diminuent l'activité catalytique. Quant aux effecteurs dits « concurrents » ils modifient l'affinité de l'apoenzyme pour le substrat; dans le cas des inhibiteurs, en particulier, il y a une véritable concurrence entre le substrat et l'inhibiteur pour se fixer sur l'apoenzyme. Cette conception n'est, bien entendu, qu'une hypothèse puisqu'on ne connaît pas la structure exacte de l'apoenzyme.

C'est le mode d'action de l'ion Mg^{++} qui a été le plus étudié. On ne possède aucun renseignement précis sur le mode de combinaison de l'activateur à l'enzyme, on suppose seulement que Mg^{++} , activant certaines phosphatases, en inhibant d'autres et étant inactif sur certaines, ne doit pas s'unir à un groupement actif du coenzyme mais à l'apoenzyme.

Pour BAUER, le substrat S se combinerait au magnésium en donnant un composé $-S-Mg^+$, lequel, s'unit à l'enzyme E pour donner $+E-Mg-S-$, facilement dissociable, et donnant naissance par l'intermédiaire de $+Mg-E-S-$ à $E-S$, lequel ne peut se former directement. La formation de $E-S$ est la première étape de l'action enzymatique. Tout le monde admet qu'il se forme une combinaison enzyme-activateur, mais le rôle de cette combinaison dans l'hydrolyse enzymatique du substrat demeure inconnu.

pH et Température. — L'activité des phosphatases ne dépend pas seulement de facteurs chimiques, elle dépend aussi

de facteurs physiques, parmi lesquels les plus importants sont le pH et la température.

Si l'on soumet un substrat à l'action d'une diastase à pH constant et à diverses températures, on constate qu'il existe une température optima pour laquelle l'hydrolyse est maxima. A froid, il n'y a pas d'action enzymatique, puis l'action croît avec l'augmentation thermique, passe par son maximum et diminue ensuite. A ce moment là, on assiste à une dénaturation des protéines par la chaleur, suivie bientôt d'une destruction totale de l'enzyme qui provoque une inactivation définitive.

L'étude de l'activité phosphatasique en fonction de la concentration en ions hydrogène présente un intérêt particulier, puisque c'est elle qui a permis d'établir une des bases de la classification des phosphatases. Il y a pour chaque diastase, une concentration optima en ions H^+ pour laquelle l'activité est maxima. Si le milieu devient trop acide ou trop basique, les phosphatases sont détruites. Il existe pour chaque phosphatase une zone de pH dans laquelle la diastase est stable. D'une manière générale, les phosphatases alcalines sont plus stables en milieu neutre ou faiblement alcalin, et les diastases acides sont plus stables en milieu faiblement acide. C'est ainsi que BAMANN et DIEDERICHs ont pu séparer les enzymes A_1 et A_2 du foie (1).

(1) BAMANN (E.) et DIEDERICHs (K.). — *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1934, 67, 2019.



CHAPITRE II

TECHNIQUES GÉNÉRALES

DESCRIPTION DE L'ORGANE

Les capsules surrénales ou glandes surrénales sont deux petits organes de couleur brunâtre qui sont situés au-dessus et en avant des reins. Le terme de capsule vient du fait que ces organes, très fragiles, sont détruits immédiatement après la mort, et n'apparaissent à l'autopsie que sous forme de capsules.

Chez l'homme, les surrénales mesurent de 3 à 4 cm. sur 8 à 10 mm. et pèsent environ 6 g. chacune; chez le bœuf, ces organes sont un peu plus gros, leur poids est de 10 à 12 g. et leur taille de 5 à 6 cm. sur 1 à 2.

« Elles sont innervées par des filets nerveux du plexus
« solaire et du plexus rénal, et irriguées par les artères capsu-
« laires, au nombre de trois, dont l'une est une ramification
« de l'aorte, la seconde provient de l'artère diaphragmatique
« supérieure et la troisième dérive de l'artère rénale.

« Une simple coupe longitudinale à travers un de ces or-
« ganes permet de distinguer très facilement deux régions :
« l'une située au centre, d'aspect grisâtre légèrement teinté de

« rose, molle et friable, percée de nombreux orifices qui sont
« la trace des vaisseaux sanguins, c'est la substance médul-
« laire; l'autre située à la périphérie plus dense et plus co-
« lorée, de consistance ferme, d'aspect jaunâtre ou même bru-
« nâtre, c'est la substance corticale. Ces deux régions cor-
« respondent en réalité à deux glandes, primitivement séparées
« chez l'embryon humain comme chez les vertébrés inférieurs;
« elles n'ont ni la même origine, ni la même structure, ni la
« même composition chimique, ni le même rôle physiologique.

« C'est ainsi que l'étude embryologique révèle que la subs-
« tance médullaire est une dépendance de l'ectoderme; elle
« est d'origine nerveuse, sympathique, et pénètre au cours du
« 2^e mois de la vie foetale à l'intérieur de la substance corticale.
« Celle-ci tire son origine de l'épithélium coelomique, donc du
« mésoderme, exactement comme les glandes génitales; elle
« prend d'ailleurs naissance à la face interne du corps de
« Wolf.

« La structure histologique de ces deux régions est égale-
« ment différente.

« Dans la région médullaire, on trouve de nombreux vais-
« seaux sanguins entourés par des cellules polyédriques dont
« un des pôles est chargé de granulations : les grains chro-
« maffines. Ces cellules, dites cellules chromaffines, sont dis-
« posées en travées épithéliales et remplissent l'espace compris
« entre les vaisseaux. On trouve de plus quelques cellules sym-
« pathiques. » (1).

La substance médullaire se colore en vert par Cl_3Fe (réac-
tion de Vulpian) et en rose par l'iode en solution aqueuse. Ces

(1) ASTRUC (A.) et GIROUX (J.). — *Les médicaments d'origine biolo-
gique*, Maloine, 1942, p. 173.

réactions sont dues à la présence des grains chromaffines qui sont le support de l'adrénaline.

Dans la région corticale, on trouve des capillaires de dimensions variables entourés par des cellules sans granulations. On peut distinguer trois régions dans la cortico-surrénale : en allant de la périphérie vers le centre on trouve la zone glomérulaire, la zone fasciculée et la zone réticulée. Il s'agit en réalité d'une même lignée cellulaire mais à des stades d'évolution différents.

Dans les cellules de la cortico-surrénale on trouve de nombreuses enclaves constituées par des lipoides. De plus, ces cellules sont riches en glutathion, carotène et acide ascorbique. Enfin, elles secrètent de nombreuses hormones dont le type est la cortico-stérone.

Le principe actif de la médullo-surrénale est l'adrénaline, obtenue cristallisée pour la première fois en 1901 par TAKAMINE. La formule fut donnée par STOLZ en 1904, c'est l'N (méthyl) dihydroxy-phényl-amino-éthanol.

Les recherches de REICHSTEIN (1936 à nos jours) ont montré l'existence dans la cortico-surrénale d'une série d'hormones dont les principales sont la cortico-stérone, la désoxy-cortico-stérone, la déhydro-cortico-stérone, l'hydroxy 17 cortico-stérone, et l'hydroxy 17 déhydro 11 cortico-stérone. Toutes ces hormones dérivent du prégnane et renferment le noyau du perhydrocyclopenténophénanthrène, rencontré également dans la progestérone, le prégnandiol et de nombreux composés naturels.

Le rôle de ces deux organes est très différent. La médullo-surrénale, par son adrénaline, possède une action caractéristique sur la musculature lisse. Elle fait contracter les capillaires sanguins, ce qui amène une élévation de la pression artérielle; elle

fait dilater les muscles bronchiques et la pupille et elle met l'intestin au repos.

La cortico-surrénale, grâce à ses nombreuses hormones, joue un rôle beaucoup plus considérable que la médullo-surrénale. Pour VERZAR, son rôle physiologique primordial serait de permettre les processus de la phosphorylation dans le métabolisme des lipides et des glucides; d'où l'intérêt de l'étude des phosphatases dans cet organe. La cortico-surrénale tient sous sa dépendance l'équilibre des constituants sanguins (Na, Cl, K, N, urée, sucre, glutathion, eau). Elle augmente la réserve alcaline, elle a une action favorable sur le métabolisme basal et, de plus, elle possède une action antitoxique très marquée. Elle interviendrait même dans la croissance et dans l'apparition des caractères sexuels secondaires. Enfin elle régulariserait la pression sanguine.

Lorsque la cortico-surrénale est altérée, en particulier par la tuberculose, il y a apparition de symptômes connus sous le nom de maladie d'Addison, symptômes qui disparaissent par l'administration d'extraits corticaux totaux ou simplement d'une seule des hormones cortico-surrénales : la désoxy-cortico-stérone qui paraît jouer le rôle essentiel.

DÉCORTICATION

Puisque les capsules surrénales sont composées de deux organes essentiellement différents, il va falloir les séparer; et les systèmes phosphatasiques seront étudiés dans les deux organes.

Le matériel utilisé n'est autre que les capsules surrénales de bovidés; ces animaux présentant l'avantage de fournir des organes assez gros, et dans lesquels la surface de séparation entre la partie corticale et la partie médullaire est nette. La

décortication est ici beaucoup plus facile que chez les autres animaux.

Les organes nous sont fournis par les abattoirs de Montpellier (1). Ils arrivent recouverts de graisses, aponévroses et tissus divers qu'il s'agit d'éliminer. Les surrénales, débarrassées des tissus étrangers qui les souillent; sont coupées en plusieurs morceaux et la zone corticale est alors séparée de la partie médullaire.

BROYAGE

Les organes ont été broyés selon deux procédés différents. D'une part nous avons utilisé le broyeur mécanique Latapie, et d'autre part nous avons broyé au mortier en présence de sable, préalablement tamisé, traité par l'acide chlorhydrique jusqu'à cessation d'effervescence, et lavé à l'eau distillée. Le sable fin et siliceux nous permet d'obtenir un broyage beaucoup plus soigné que l'appareil Latapie. Aussi, est-ce cette deuxième méthode que nous avons utilisée de préférence à la première.

MACÉRATION

La pulpe obtenue est mise à macérer dans de l'eau distillée. Le rapport du poids d'organe au poids d'eau utilisé a été fixé une fois pour toutes à $1/3$; la préparation sera donc au $1/4$ d'organe frais.

La macération a lieu dans un Erlenmeyer bouché à la température du laboratoire; pour la conservation, nous ajoutons au milieu quelques gouttes de toluène. Afin de vérifier si l'an-

(1) Nous adressons nos plus vifs remerciements à M. le docteur vétérinaire DEDIEU, directeur des abattoirs, pour l'obligeance avec laquelle il nous a fourni tous les organes dont nous avons eu besoin.

tiseptique assurait une bonne conservation, une macération fut gardée plus d'un mois en présence de toluène à la température du laboratoire, et nous n'avons pas observé de développement microbien (1) tandis que le dosage de NH_4^+ par micro-Schlössing réalisé tous les deux jours pendant un mois ne montrait pas de grandes variations. Au contraire, une préparation sans toluène conservée le même temps montrait au bout de quelques heures un développement microbien abondant, tandis que la quantité d'ammoniaque croissait rapidement.

Les macérations d'organes sont agitées pendant un certain temps, pour aider au passage en solution des diastases. Elles sont arrêtées au bout d'un temps plus ou moins long qui généralement n'excède pas 24 heures. On les centrifuge alors, et, tandis que le culot est rejeté ou sert à une deuxième macération, le produit liquide est porté à la glacière après l'addition de quelques gouttes de toluène.

HYDROLYSE

L'hydrolyse est réalisée à la température de 37° . Le macéré retiré de la glacière est additionné de l'ester phosphorique, et le tout est porté à l'étuve à 37° pendant un temps déterminé au bout duquel on arrête l'hydrolyse par l'acide trichloracétique. Dans chaque tube, on introduit 1 cm^3 de macération, 3 cm^3 d'une solution d'ester phosphorique à 0 mg. 7 de phosphore par cm^3 , une quantité variable d'une solution alcaline ou acide pour obtenir le pH désiré. Enfin on complète à 10 cm^3 avec de l'eau distillée. Pour éviter les fermentations, on ajoute dans chaque tube quelques gouttes de chloroforme.

(1) Les expériences de contrôle ont été réalisées au laboratoire de Microbiologie, grâce à l'obligeance de M. BESSIÈRE à qui nous adressons nos sincères remerciements.

La solution d'ester phosphorique sera soit une solution de β glycérophosphate de Na pour l'étude des phosphomonoestérases, soit une solution de pyrophosphate de Na pour l'étude des pyrophosphatases, soit enfin une solution de métaphosphate de Na, de diméthylphosphate de Na, ou de phytine. Le pH est mesuré électrométriquement au potentio-pH mètre de Jouan à électrode de verre, avec une précision de 0,1 unité de pH.

Au cours de l'hydrolyse on remarque que le pH des solutions varie : en milieu acide il croît, et en milieu basique il décroît. C'est surtout en milieu basique que l'on rencontre le plus de variations. Pour réduire au minimum ces variations, nous avons été contraints d'utiliser des mélanges tampons; mais on ne peut employer les mélanges habituels, car on ne doit pas introduire dans le milieu des éléments susceptibles d'avoir une action quelconque (activatrice ou inhibitrice) sur l'hydrolyse phosphatasique des esters phosphoriques. Nous avons utilisé des tampons inactifs sur l'action phosphatasique, à savoir : en milieu acide des tampons acéto-acétiques, en milieu basique des tampons au véronal sodique. Avec le véronal sodique (1) nous avons préparé les solutions tampons de MICHAELIS (2) et nous avons utilisé une méthode analogue à celle de KING et DELORY (3). Dans chaque tube nous ajouterons 2 cm³ de solution tampon avant d'ajuster le pH.

Quant nous voulons étudier l'action d'un effecteur sur l'activité phosphatasique, nous préparons une solution M/10 du produit à étudier et nous ajoutons 1 cm³ de cette solution pour

(1) Le véronal sodique ou médinal, actuellement introuvable, nous a été aimablement fourni par M. CASTEL, chargé du cours de pharmacie chimique, que nous remercions bien vivement.

(2) MICHAELIS. — *J. Biol. Chem.*, 1930, 87, 33.

(3) KING (E. J.) et DELORY (C. E.). — *Enzymologia*, 1940, 8, 4, 278.

1 cm³ de macération, de façon à ce que la concentration du milieu en effecteur soit de M/100.

Les tubes contenant la macération, la solution d'ester, la solution tampon, la solution d'effecteur sont amenés par l'addition de solution acide ou basique au pH désiré, et ils sont complétés à 10 cm³ avec de l'eau distillée. On ajoute quelques gouttes de chloroforme et on porte à l'étuve.

Pour les temps courts (inférieurs à 6 heures), il est nécessaire de tremper les tubes dans de l'eau chaude de façon à ce que la température de 37° soit vite atteinte. A ce moment-là seulement, on met les tubes à l'étuve. Les tubes retirés de l'étuve sont immédiatement refroidis, après quoi on prélève 1 cm³ du mélange, auquel on ajoute immédiatement 2 cm³ de solution à 20 % d'acide trichloracétique.

Le pH de chaque tube est mesuré à nouveau afin de constater s'il n'a pas subi de grandes variations. Si la variation est trop forte, on recommence l'expérience avec un temps d'hydrolyse plus court.

L'acide trichloracétique précipite les protéines et arrête l'hydrolyse. Dans chaque tube nous ajoutons 7 cm³ d'eau distillée pour avoir une dilution de 1/10. Nous mélangeons et filtrons. On prélève 2 cm³ de filtrat correspondant à 1/50 de cm³ de macération et sur ces 2 cm³ on va doser l'acide phosphorique libéré.

DOSAGE DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE LIBÉRÉ

L'acide phosphorique a été dosé par la méthode colorimétrique de BRIGGS. Cette méthode est basée sur le fait que l'ion phosphorique s'unit à l'ion molybdique pour donner un complexe, lequel soumis à l'action des réducteurs va donner

une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de complexe phosphomolybdique.

Les réducteurs utilisés sont le sulfite de sodium et l'hydroquinone. A 2 cm³ de produit à doser, on ajoute 2 cm³ d'une solution sulfurique de molybdate d'ammonium, 1 cm³ d'une solution fraîche de sulfite de soude à 20 %, 1 cm³ d'une solution d'hydroquinone à 0,5 % et on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. La coloration bleue atteint son maximum au bout d'une demi-heure. On fait le dosage au colorimètre DUBOSQ comparativement à une solution de PO₄ H₂ K, dosée à 0,025 mg. de phosphore pour 2 cm³. Les résultats sont donnés avec une précision de 3 % environ. La solution sulfurique de molybdate est obtenue en faisant dissoudre 25 g. de molybdate d'ammonium dans 300 cm³ d'eau; après filtration de cette solution, on y ajoute un mélange refroidi de 75 cm³ de SO₄ H₂ concentré et de 125 cm³ d'eau.

Une modification dans la technique est apportée dans l'étude des pyrophosphatases (1). En milieu fortement sulfurique les pyrophosphates sont rapidement transformés en orthophosphates. Aussi le dosage doit être beaucoup plus rapide. On doit le faire vingt minutes exactement après l'apparition de la coloration.

(1) DURAND (J.), — *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1943.

CHAPITRE III

LE SYSTÈME PHOSPHOMONOESTERASIQUE

Le système phosphomonoestérasique de la cortico et de la médullo-surrénale a été étudié en détail, d'abord sur la macération d'organe frais, puis sur celle de la poudre acétonique. Nous avons ensuite comparé l'activité de la principale des phosphomonoestérases (le diastase A_1) dans les deux organes. Et nous avons terminé par l'étude des effecteurs.

I. — ÉTUDE DE L'ORGANE FRAIS

Afin de pouvoir examiner totalement le système phosphomonoestérasique de la macération d'organe frais, nous avons effectué une série d'épuisements successifs. La pulpe d'organe est mise à macérer dans trois fois son poids d'eau, pendant 24 heures. Au bout de ce temps, on centrifuge et on met de côté le premier liquide d'épuisement : L_1 . Le culot sera repris par trois fois son poids d'eau pendant 24 heures, au bout desquelles on séparera par centrifugation le deuxième liquide d'épuisement : L_2 . L'opération sera effectuée quatre fois avec la cortico-surrénale et trois fois avec la médullo-surrénale.

De cette façon, nous épuisons successivement, d'abord les diastases facilement mises en solution ou lyoenzymes, ensuite les diastases plus fortement retenues par les tissus ou desmoenzymes.

Les liquides d'épuisement obtenus sont dialysés à la glacière contre de l'eau distillée, à raison de cinq parties d'eau pour une partie de liquide de macération. L'eau est changée toutes les deux heures au début, et de moins en moins fréquemment par la suite, jusqu'à ce que sa conductivité soit très faible et pratiquement invariable.

Ces dialyses furent faites au laboratoire de M. le professeur CANALS; et les courbes de conductivité obtenues montrent que l'on peut considérer la dialyse comme pratiquement terminée au bout de 48 heures; un temps plus long risquerait de décomposer les diastases en coferment et apoferment.

L'activité phosphatasique en fonction du pH fut étudiée pour chacun des liquides d'épuisement dialysés et non dialysés.

Nous connaissons déjà l'importance de l'action effectrice du magnésium : nous savons que les phosphomonoestérases A_1 (pH 9) et A_4 (pH 6-6,4) sont activées par l'ion Mg^{++} , tandis que la diastase A_2 (pH 5-6) est insensible à son action et que la diastase A_3 (pH 3-4) est inhibée par lui. Cet ion nous permettra donc de caractériser les enzymes de nos préparations, et nous effectuerons pour chaque liquide d'épuisement dialysé et non dialysé, une expérience sans magnésium et la même expérience en présence de l'ion Mg^{++} .

La quantité de magnésium utilisée est telle que $q\ Mg = 2$, car c'est la concentration qui nous a donné la plus grande activation de la phosphatase A_1 (voir la courbe, à la partie : Effecteurs). Le magnésium est introduit sous forme de sulfate, l'ion sulfurique étant neutre, à faible concentration, vis-à-vis

des diastases. On utilisera, une solution M/10 de $\text{SO}_4 \text{ Mg}$; et la concentration en ions Mg^{++} du milieu expérimental sera de M/100.

Toutes les expériences que nous décrivons dans ce travail ont été réalisées plusieurs fois, et ce sont les résultats moyens que nous avons consignés dans les tableaux. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de substrat hydrolysé, ou de phosphore total libéré. Ils indiquent l'activité phosphatasique relative.

A) Cortico-surrénale

Les premières expériences, effectuées avec la cortico-surrénale, nous montrèrent une différence d'activité phosphatasique énorme entre le produit amené à pH acide, et celui conduit à pH basique. Au bout de quelques heures d'étuve à 37° , alors que l'activité phosphatasique en milieu acide était encore négligeable, nous trouvions dans la région basique une valeur de pH pour laquelle plus de 50 % de substrat était hydrolysé. Si l'hydrolyse était poursuivie 24 ou 48 heures, on voyait alors apparaître une activité appréciable dans la région acide, tandis que, en milieu alcalin, l'activité, qui paraissait avoir atteint son maximum, avait une valeur uniforme pour toute une zone de pH.

Et ceci nous conduisit à utiliser des temps d'hydrolyse différents, suivant la zone de pH que l'on voulait étudier. Les temps les plus indiqués furent de 2 heures pour le milieu basique, et de 24 heures ou même 48 heures pour le milieu acide; dans ces conditions on obtenait des courbes très correctes.

Pour chacun des liquides d'épuisement dialysés et non dialysés, nous avons étudié séparément, d'abord la zone acide, ensuite la zone basique.

1° PREMIER LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L₁

a) Produit non dialysé.

Zone acide (48 heures d'hydrolyse) : nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU I

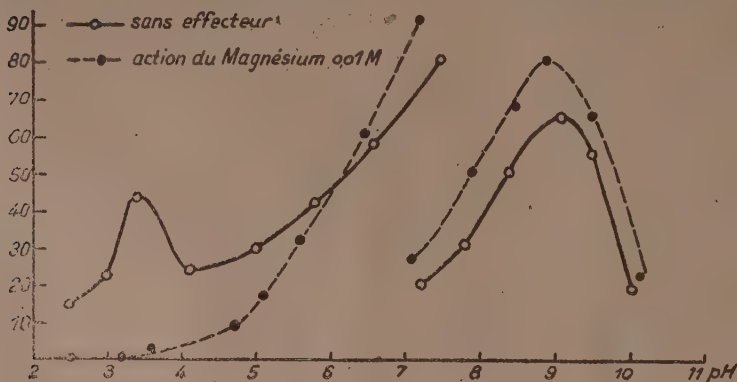
Sans Mg :									
pH	2,5	3	3,4	4,1	5	5,8	6,6	7,5	
P %	15	23	44	24	30	42	58	80	
Avec Mg :									
pH	2,5	3,2	3,6	4,7	5,1	5,6	6,5	7,2	
P %	0	0	3	9	17	32	60	91	

Nous remarquons un maximum très net de l'activité phosphatasique, correspondant à une valeur de pH = 3,4, dans l'expérience sans magnésium, mais si on opère en présence de Mg⁺⁺, ce maximum disparaît et l'activité phosphatasique devient très faible pour les valeurs de pH inférieures à 5. Ces premiers résultats nous laissent supposer que nous sommes en présence de la phosphomonoestérase A₃ (pH optimum 3-4) qui est inhibé par l'ion Mg⁺⁺.

Le système phosphomonoestérasique de la cortico-surrénale.

(organe frais - 1^{er} liquide d'épuisement)

p% Zone acide : 48 h. d'hydrolyse Zone basique : 2 h. d'hydrolyse



Zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU II

Sans Mg :

pH	7,2	7,8	8,4	9,1	9,5	10
P %	20	31	50	65	55	18

Avec Mg :

pH	7,1	7,9	8,5	8,9	9,5	10,1
P %	27	50	67	80	65	22

Ces résultats nous montrent une activité phosphatasique très importante ayant son maximum aux environs de 9. Ce maximum est encore plus grand lorsque l'on ajoute du magnésium. Il semble donc que nous ayons dans notre préparation la phosphomonoestérase A_1 (pH optimum 9) qui est activé par l'ion Mg^{++} .

b) Produit dialysé.

Le produit qui a été dialysé pendant 48 heures contre de l'eau distillée nous donna les résultats suivants :

Zone acide (48 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU III

Sans Mg :

pH	2,6	3,5	3,7	4,5	5,5	6,1	6,8
P %	5	44	41	39	48	57	71

Avec Mg :

pH	2,6	3	3,6	4,3	5,5	6	7,3
P %	0	0	3	10	27	39	69

Comme dans le cas du produit dialysé, le tableau montre un maximum très net pour la valeur de $pH = 3,5$. Ce maximum n'existe plus dans le cas où nous avons du magnésium dans le milieu.

Zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU IV

Sans Mg :						
pH	6,7	7,5	8	9,1	9,6	10,6
P %	7	21	39	68	65	3

Avec Mg :						
pH	6,8	7,5	8,3	9	9,8	10,2
P %	6	29	61	88	73	46

Nous retrouvons ici un fort maximum au pH 9,1, maximum qui est encore plus élevé dans le milieu contenant du magnésium.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS : L'étude de l'activité phosphomonoestérasiqne en fonction du pH de la macération de cortico-surrénale, avant et après dialyse, semble indiquer que la cortico-surrénale possède deux phosphomonoestérases : l'une, de pH optimum 3,5, inhibée par l'ion Mg^{++} , peut être identifiée avec la phosphomonoestérase A_3 , rencontrée surtout dans le règne végétal, mais qui a été signalée dans le rein par MUNEMURA et OHMORI (1-2) et dans le foie par BAMANN et SALZER (3).

La deuxième phosphomonoestérase de pH optimum 9, activée par l'ion Mg^{++} , n'est autre que la phosphatase alcaline que l'on rencontre dans presque tous les organes animaux. Il est intéressant de noter l'énorme différence d'activité de ces deux diastases, la phosphatase alcaline hydrolysant en 2 heures 65 % de substrat, la phosphatase très acide mettant 48 heures pour hydrolyser 45 % de substrat.

Une autre remarque s'impose : c'est qu'il y a très peu de

(1) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

(2) OHMORI (Y.). — *Enzymologia*, 1937, 4, 217.

(3) BAMANN (E.) et SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, 286, 147.

différence entre les résultats que nous ont donné le produit non dialysé d'une part, le produit dialysé d'autre part. La seule différence, et elle est minime, consiste en une activation par l'ion Mg^{++} légèrement plus forte sur le produit dialysé.

2° DEUXIÈME LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L_2

a) *Produit non dialysé.*

Zone acide (48 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU V

Sans Mg :						
pH	2,5	3,4	4	4,7	5,3	6
P %	5	13	7	13	22	36
Avec Mg :						
pH	3,2	3,7	4,4	4,9	5,5	6,7
P %	0	3	5	14	30	53

On retrouve ici un maximum pour le pH 3,4, dans le milieu sans magnésium seulement.

Zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU VI

Sans Mg :						
pH	7	7,9	8,5	9,2	9,6	10,5
P %	7	29	41	45	35	43
Avec Mg :						
pH	6,8	7,6	8,1	8,6	9,2	9,9
P %	6	27	45	57	58	31

Comme dans le cas du premier liquide d'épuisement, on trouve un maximum au pH 9,2, maximum augmenté en présence de magnésium.

b) *Produit dialysé.*

Zone acide (48 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU VII

Sans Mg :						
pH	2,6	3,3	3,7	4,1	5,3	5,8
P %	3	17	6	13	30	44

Avec Mg :

pH	2,7	3,4	4	4,8	5,5	6,5
P %	0	2	7	18	25	48

De nouveau maximum à pH 3,3 dans l'expérience sans magnésium.

Zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU VIII

Sans Mg :

pH	6,9	7,7	8,2	8,6	9,2	10
P %	5	14	24	40	46	23

Avec Mg :

pH	6,9	7,7	8,1	8,5	9,1	10,2
P %	8	33	49	62	71	24

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — Le deuxième liquide d'épuisement nous fournit des résultats tout à fait analogues à ceux que nous avait donnés le premier liquide. Il ne semble donc pas y avoir dans la cortico-surrénale des phosphomonoestérases autres que A_1 et A_3 . La seule différence que nous avons observée est une différence d'intensité d'activité, qui se comprend aisément, puisque le premier liquide a épuisé la majeure partie des diastases. Comme dans le cas précédent, il y a très peu de différence entre les résultats fournis par le produit non dialysé et ceux que nous a donnés le produit dialysé.

3° TROISIÈME LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L_3

a) *Produit non dialysé.*

Zone acide (48 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU IX

Sans Mg :

pH	2,7	3,2	4,3	5,2	6,2	6,8
P %	6	10	10	14	14	16

Avec Mg :

pH	2,8	3,5	4,5	5	5,8	6,7
P %	0	2	3	4	9	17

L'activité phosphatasique est à peine apparente, on ne trouve plus de maximum, mais on remarque encore que l'activité est plus faible en présence de l'ion Mg^{++} .

Zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU X

Sans Mg :						
pH	7,1	8	8,9	9,2	10	
P %	0	9	13	14	0	
Avec Mg :						
pH	7	7,5	8,3	9	9,6	10
P %	0	4	10	17	10	0

Malgré la diminution de l'activité, le maximum en 9,2 est encore apparent et l'action du magnésium se voit encore assez nettement.

b) *Produit dialysé.*

Zone acide (48 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU XI

Sans Mg :						
pH	2,6	3,9	4,6	5,2	6	6,6
P %	1	6	6	7	7	9
Avec Mg :						
pH	2,6	3,5	4	4,8	5,8	6,7
P %	0	1	1	3	5	11

Plus de maximum, activité plus faible en présence de l'ion Mg^{++} .

Zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU XII

Sans Mg :						
pH	6,9	7,6	8,2	8,9	9,2	9,9
P %	2	4	7	9	10	0
Avec Mg :						
pH	7	7,8	8,4	9	9,3	10,1
P %	0	5	9	12	11	2

Maximum à 9,2, encore faiblement augmenté par le magnésium.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — Les deux premiers liquides ont presque totalement épuisé les organes de leurs diastases. Aucune nouvelle phosphatase n'apparaît. La phosphatase très acide ne montre plus de maximum, et on ne la décèle qu'en faisant le rapport de l'activité phosphatasique en l'absence et en présence de magnésium. La phosphatase alcaline montre encore un maximum, mais considérablement plus bas que dans les deux premiers liquides.

4° QUATRIÈME LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L₄

Nous ne retrouvons plus aucune activité en milieu acide. Dans la zone alcaline on remarque une très faible activité aux environs du pH 9. Les diastases A₁ et A₂ semblent entièrement épuisées.

B) Médullo-surrénale

Les premiers essais réalisés sur la médullo-surrénale n'ont pas montré les écarts considérables d'activité, entre le produit à pH acide et le produit à pH basique, que nous avons observés pour la cortico-surrénale. Aussi nous avons pu, dans le cas de la médullaire, utiliser le même temps d'hydrolyse pour les pH basiques et pour les pH acides.

Et comme l'activité phosphatasique était assez faible, on utilisa des temps longs : 24 heures et 48 heures. Ici également nous avons réalisé plusieurs épuisements successifs (trois) et chacun des liquides d'épuisement a été étudié avant et après dialyse. Nous avons consigné les résultats obtenus au bout de

24 heures et de 48 heures d'étuve, ces derniers nous servant de contrôle.

1° PREMIER LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L₁

a) Non dialysé.

24 heures d'hydrolyse :

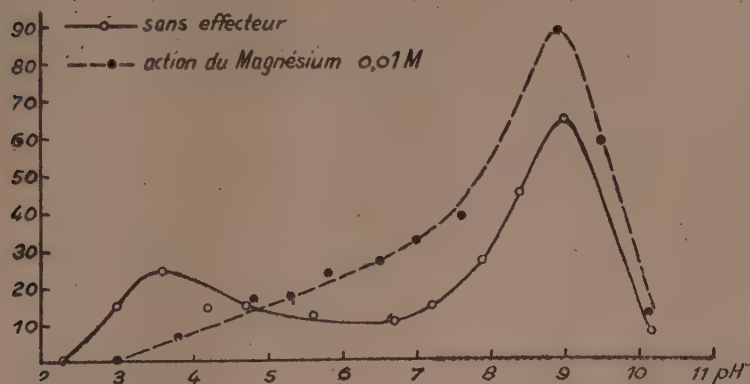
TABLEAU XIII

Sans Mg :												
pH	2,3	3	3,6	4,2	4,7	5,6	6,7	7,2	7,9	8,4	9	10,2
P %	0	15	24	14	14	12	10	14	26	44	64	7
Avec Mg :												
pH	2,3	3	3,8	4,8	5,3	5,8	6,5	7	7,6	8,9	9,5	10,3
P %	0	0	7	17	17	23	26	32	38	88	58	11

Le système phosphomonoestérasique de la médullo-surrénale.

(Organe frais. 1^{er} liquide d'épuisement)

24 h. d'hydrolyse.



Ce premier résultat nous montre deux maximums, l'un pour le pH 3,6 et l'autre pour le pH 9, ce dernier nettement plus fort que le premier et augmenté par l'ion Mg^{++} qui fait disparaître le premier. Au premier abord, ces résultats pré-

sentent assez d'analogie avec ceux que donnaient la cortico-surrénale.

48 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XIV

Sans Mg :													
pH	2,4	3,1	3,7	4,4	4,7	5,7	6,6	7,3	8	8,5	8,9	9,9	
P %	0	29	38	33	33	25	17	28	45	68	69	10	
Avec Mg :													
pH	2,4	3,1	3,9	4,9	5,4	5,9	6,5	7,1	8,2	9	9,7	10,5	
P %	0	0	15	28	33	40	50	57	77	55	23	0	

Résultats identiques avec une activité plus forte. A noter cependant la diminution (de 88 à 77) du maximum à pH 9 en présence de l'ion Mg^{++} , diminution qui serait peut-être due à une destruction de l'enzyme (?).

b) Dialysé.

24 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XV

Sans Mg :													
pH	2,2	3	3,5	4,8	5,5	6,1	6,8	8	8,3	9,1	9,7	10,2	
P %	0	24	26	23	19	15	15	31	51	64	49	19	
Avec Mg :													
pH	2,1	3,2	3,7	4,5	5,1	5,7	6,7	7,4	8	8,8	9,5	10,5	
P %	0	3	6	10	13	17	20	36	48	73	87	0	

Résultats en tous points comparables à ceux du tableau XIII.

48 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XVI

Sans Mg :													
pH	2,3	3,1	3,5	4,8	5,6	6	6,7	7,8	8,3	9	9,5	10	
P %	0	38	40	34	30	29	32	42	64	72	58	20	
Avec Mg :													
pH	2,1	3,2	3,7	4,5	5,1	5,6	6,6	7,3	7,9	8,2	8,8	9,6	
P %	0	4	14	20	29	30	46	65	72	76	72	49	

Les chiffres obtenus sont comparables à ceux fournis par le produit non dialysé.

Il semble bien que l'on retrouve dans la médullo-surrénale les mêmes phosphomonoestérases qui avaient été observées dans la cortico-surrénale, c'est-à-dire A_1 (pH optimum 9), activée par l'ion Mg^{++} et A_3 (pH optimum 3-4) inhibée par lui. Mais, alors que l'activité de A_2 est comparable dans les deux organes, celle de A_1 est ici beaucoup plus faible. On peut faire les mêmes remarques sur la dialyse qui n'amène aucun changement appréciable.

2° DEUXIÈME LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L_2

a) *Non dialysé.*

24 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XVII

Sans Mg :												
pH	2,1	3,3	4,3	4,7	5,5	6,3	6,9	7,7	8,2	9	9,4	10,1
P %	0	5	8	7	6	4	4	7	14	35	38	22
Avec Mg :												
pH	2,8	4,2	5,1	5,6	6,1	6,6	7,2	7,9	8,4	8,9	9,4	10,2
P %	0	4	5	5	10	14	16	27	33	45	54	20

On observe toujours le maximum à pH 9-9,4, mais celui à pH 3,5 est à peine visible. L'activation et l'inhibition par le magnésium sont nettes.

48 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XVIII

Sans Mg :												
pH	2,2	3,2	4,5	4,8	5,5	6,2	6,7	7,6	8,5	8,9	9,5	10
P %	0	10	12	12	8	5	5	14	33	51	44	21
Avec Mg :												
pH	2,3	2,9	4,1	5,1	5,6	6	6,5	7,3	8	8,4	8,9	9,8
P %	0	2	5	5	6	7	9	30	45	58	72	24

Activité plus forte, le maximum acide devient plus visible.

b) Dialysé.

24 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XIX

Sans Mg :													
pH	2,4	3,2	4	4,6	5,8	6,5	7	7,6	8,1	8,8	9,2	10,2	
P %	0	5	6	5	6	6	9	11	20	31	35	2	
Avec Mg :													
pH	2,9	3,7	4,6	5,4	6,6	7,1	8	8,5	8,8	9,1	9,5	10,1	
P %	0	3	4	4	7	11	29	39	41	39	34	10	

Les résultats sont analogues à ceux du tableau XVII avec une seule différence : l'activation par l'ion Mg^{++} de la diastase A_1 est moins nette.

48 heures d'hydrolyse :

TABLEAU XX

Sans Mg :													
pH	2,4	3,2	3,9	4,6	5,7	6,4	6,9	7,5	8,2	8,8	9,2	10	
P %	0	9	12	10	9	11	14	24	35	50	45	4	
Avec Mg :													
pH	2,9	3,8	4,6	5,3	6,5	6,9	7,8	8	8,4	9,2	9,5	10,2	
P %	0	4	4	7	19	25	45	53	57	52	41	12	

Ici même remarque : les résultats sont semblables à ceux du tableau XVIII, avec une activation moindre de la phosphatase alcaline par le magnésium.

Le premier liquide a épuisé une bonne partie des diastases, il n'apparaît pas de desmoenzyme.

3° TROISIÈME LIQUIDE D'ÉPUISEMENT L_3

Les résultats obtenus montrent une absence totale d'activité phosphatasique, si ce n'est pour le pH 9 où elle est infime. Les deux premiers liquides ont totalement épuisé l'organe.

*
**

En résumé :

1° Les macérations fraîches de cortico-surrénale renferment deux phosphomonoestérases d'activité très inégale : l'une, très fortement active, la phosphatase alcaline A_1 que l'on rencontre dans presque tous les tissus animaux; l'autre, faiblement active, la phosphatase très acide A_3 rencontrée surtout chez les végétaux.

Deux épuisements successifs de 24 heures chacun enlèvent toutes les diastases à l'organe broyé. Ces phosphatases doivent être des lyoenzymes, on ne décèle pas de desmoenzymes.

La dialyse complète contre de l'eau distillée n'amène aucun changement appréciable dans l'intensité de l'activité phosphatasique des organes, tant en présence qu'en l'absence de magnésium.

2° Les macérations fraîches de médullo-surrénale renferment, comme celles de cortico-surrénale, deux phosphomonoestérases décrites par les auteurs sous les termes A_1 et A_3 .

L'activité de ces deux phosphatases est inégale, la diastase A_1 étant plus active que la phosphatase A_3 , mais ici les deux valeurs sont dans un ordre comparable.

Deux épuisements successifs de 24 heures chacun enlèvent toutes les phosphatases à l'organe broyé : on ne trouve ici également que les lyoenzymes. De même, la dialyse contre de l'eau distillée n'amène aucun changement appréciable.

3° La grande différence entre la cortico et la médullo-surrénale réside dans l'intensité de l'activité de la diastase A_1 , celle-ci étant beaucoup plus active dans la cortico-surrénale. D'où l'utilité de l'étude comparée des vitesses de réaction de

cette diastase dans les deux organes, étude que nous avons entreprise plus loin.

II. — ÉTUDE DE LA POUDRE ACÉTONIQUE

Les macérations d'organes, qui ont été étudiées ci-dessus, sont des milieux très complexes où les phosphatases coexistent avec des activateurs ou des inhibiteurs naturels non dialysables. Nous avons cherché à préparer un produit plus pur en utilisant une méthode nous permettant d'éliminer les protéines, les lipides, etc... sans altérer les diastases. La méthode employée utilise l'acétone (1).

MODE OPÉRATOIRE

200 g. de cortico-surrénale (exempte de médullaire) sont traités au broyeur Latapie. La pulpe recueillie est pesée, puis traitée par dix fois son poids d'acétone pure. On agite fréquemment et on laisse en contact pendant 24 heures. Le produit est ensuite décanté, essoré et traité à nouveau par cinq fois son poids d'acétone; on laisse en contact 24 heures en agitant fréquemment. La poudre décantée, essorée, est traitée une dernière fois par cinq fois son poids d'acétone. Enfin, après un dernier essorage, la poudre est desséchée dans un excicateur où l'on fait un vide très poussé, pour éliminer l'excès d'acétone qu'elle peut contenir. Après dessiccation, on place la poudre dans un flacon sec bouché à l'émeri. 170 g. de pulpe donnent 34 g. de produit sec, soit 1 pour 5. La médullo-surrénale subit le même traitement.

(1) M. le professeur ROCHE de la Faculté de Marseille nous a fortement engagé à utiliser cette méthode qui lui donne de très bons résultats.

L'acétone a dégraissé le produit et déshydraté les protéines; ainsi on obtient une poudre qui peut être conservée très longtemps. Les protéines deshydratées sont dénaturées, les phosphatases ne le sont pas.

MACÉRATION

La poudre d'organe est mise à macérer dans l'eau distillée en respectant les proportions : on ajoute à un poids p. de poudre, 4 p. d'eau distillée, de manière à avoir l'équivalence en organe frais, plus trois fois le poids de l'organe frais, soit 3×5 p. d'eau distillée. La poudre est broyée au mortier avec du sable, et l'eau est ajoutée par petites fractions pour faciliter le broyage. Le mélange final est mis dans un Erlenmeyer, qui est abandonné à la température du laboratoire. On laisse macérer 24 heures avec agitation; au bout de ce temps, on sépare le liquide d'épuisement par centrifugation.

C'est sur le premier liquide d'épuisement que nous avons étudié l'activité phosphatasique en fonction du pH d'abord chez la cortico-surrénale, ensuite chez la médullo-surrénale.

A) Cortico-surrénale

L'activité phosphatasique a été étudiée en l'absence et en présence de l'ion Mg^{++} . Nous avons étudié séparément la zone acide et la zone basique. Les résultats obtenus furent les suivants :

a) Pour la zone acide (48 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU XXI

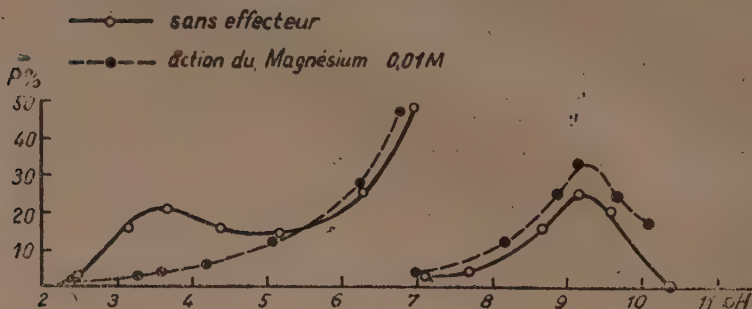
Sans Mg :							
pH	2,5	3,2	3,7	4,4	5,2	6,3	7
P %	3	16	21	16	14	25	48
Avec Mg :							
pH	2,4	3,3	3,6	4,2	5,1	6,3	6,8
P %	2	3	4	6	12	28	47

Le maximum en 3,7 se retrouve très nettement dans le milieu dépourvu de magnésium, mais il est beaucoup plus faible que dans le cas de l'organe frais. En présence de magnésium, l'activité phosphatasique est très réduite dans cette zone.

*Le système phosphomonoestérasique de la cortico-surrénale
(poudre acétonique)*

Zone acide: 48 h. d'hydrolyse

Zone basique: 2 h. d'hydrolyse



b) Pour la zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU XXII

Sans Mg :						
pH	7,1	7,7	8,7	9,2	9,6	10,4
P %	3	4	15	25	20	0
Avec Mg :						
pH	7	8,2	8,9	9,2	9,7	10,1
P %	4	12	25	33	24	17

Nous retrouvons en 9,2 un maximum que renforce la présence de magnésium, mais on peut faire ici la même constatation que pour la zone acide : la valeur du maximum est bien plus faible que dans le cas de l'organe frais.

Nous avons alors étudié comparativement, et en opérant rigoureusement dans les mêmes conditions de temps d'étuve et de concentration en organes, les activités phosphatasiques des

macérations d'organe frais et de poudre acétonique pour les pH optimums seulement.

La macération d'organe frais correspond au premier liquide d'épuisement L₁. Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XXIII

24 heures d'hydrolyse :				2 heures d'hydrolyse :			
organe frais		poudre acétonique		organe frais		poudre acétonique	
pH	P %	pH	P %	pH	P %	pH	P %
3,5	30	3,5	14	8,7	56	8,6	21
3,7	35	3,6	16	9,1	60	9,1	30
3,9	33	4	10	9,6	45	9,7	28

Ce tableau nous montre que le traitement par l'acétone de la cortico-surrénale lui fait perdre environ la moitié de son activité phosphomonoestérasique.

A quoi peut être due cette perte d'activité? Deux hypothèses se présentent : ou bien, l'acétone enlèverait un activateur, et on doit remarquer que ce corps soluble dans l'acétone n'est pas dialysable, ou bien, on assisterait simplement à une dénaturation partielle des diastases.

En tout cas, nous avons examiné l'activité phosphatasique de la poudre acétonique de cortico-surrénale, à laquelle nous avons ajouté le résidu provenant de l'évaporation de l'acétone qui avait servi à traiter l'organe. Ce résidu a été totalement sans action; il n'a pas redonné à la poudre acétonique l'activité du produit frais.

B) Médullo-surrénale

Nous avons ensuite examiné l'activité phosphatasique des macérations de poudre acétonique de médullo-surrénale avec et sans magnésium. Après 24 heures d'hydrolyse, nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XXIV

Sans Mg :												
pH	2,4	3,5	4	4,6	5,2	6,2	6,9	7,5	8,2	9	9,5	10,2
P %	2	22	17	13	10	10	14	18	32	57	43	7
Avec Mg :												
pH	2,5	3	3,9	5	5,8	6,5	7,2	7,9	8,4	8,9	9,4	9,9
P %	0	0	3	6	13	19	27	40	60	72	57	30

Ces résultats nous montrent d'abord 2 maximums dans le milieu dépourvu de magnésium, l'un à 3,5, l'autre à 9; ensuite dans le milieu contenant du magnésium un seul maximum à 8,9.

Si maintenant nous comparons ce tableau avec le tableau XIII (médullo-surrénale, non dialysée, premier épuisement, 24 heures d'hydrolyse) nous constatons très peu de différences entre ces deux tableaux. Les valeurs des maximums sont simplement légèrement plus faibles dans le cas de la poudre acétonique. On ne retrouve plus ici, comme dans le cas de la cortico-surrénale, la perte de 50 %. La faible diminution d'activité que l'on constate doit être due aux pertes consécutives aux manipulations.

LES ADSORPTIONS

Nous avons essayé d'obtenir des diastases plus pures en utilisant la méthode des adsorptions. La technique que nous avons employée est celle décrite par A. LAURENS (1). L'adsorbant utilisé est l'alumine recommandée pour les adsorptions chromatographiques et livrée par Rhône-Poulenc.

Dans une série de 12 tubes nous avons mis en contact 5 cm³ de macération de cortico-surrénale (fraîche) et 0,25 g. d'alumine. Les différents tubes ont été portés à des pH différents; on les soumet ensuite à une agitation de 30 minutes à 20°, et on centrifuge. On dosera l'activité phosphomonoestérasique à

(1) LAURENS (A.). — *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1942.

pH 9 : 1° du liquide surnageant; 2° du culot mis en suspensions dans 5 cm³ d'eau distillée.

Le pH de chaque liquide surnageant est ramené à la neutralité, puis à 0,5 cm³ de liquide ou de suspension, on ajoute 1,5 cm³ de solution de β glycérophosphate de sodium à 6,91 pour mille, c'est-à-dire à 0,7 mg. de phosphore par cm³, et 1 cm³ de Véronal sodique M/10. Le pH du mélange est porté à 9; on complète à 5 cm³ avec de l'eau distillée.

Voici les résultats obtenus après deux heures d'hydrolyse (les pH indiqués sont les pH d'adsorption) :

TABLEAU XXV

pH d'adsorption :	3,2	4	4,5	5	6	6,5	7,2	8	8,2	8,6	9	9,5
P % liq. surnageant :	29	28	13	22	26	32	33	31	32	33	29	28
P % adsorbat :	10	21	28	19	17	16	16	16	15	12	12	9

Ce tableau nous montre que la meilleure adsorption est réalisée aux environs de pH 4,5.

Le temps nous a manqué pour poursuivre cette étude, qui sera reprise par la suite.

III. — LES VITESSES DE RÉACTION DE LA PHOSPHATASE A₁

Au cours de l'étude du système phosphomonoestérasique des deux parties de la capsule surrénale, nous avons remarqué que la phosphatase A₁ avait une activité beaucoup plus forte chez la cortico-surrénale que chez le médullo-surrénale. En effet, dans les macérations de la zone corticale, cette diastase hydrolyse en deux heures jusqu'à 65 % du substrat, tandis qu'il faut à la phosphatase A₁ de la médullaire 24 heures pour hydrolyser le même pourcentage.

Il nous a paru intéressant de comparer les activités de cette diastase en suivant l'hydrolyse, c'est-à-dire en dosant, à des intervalles de temps réguliers, la quantité d'acide phosphorique libéré.

La technique utilisée a été la suivante. Dans un Erlenmeyer on introduit une quantité déterminée de macération, trois fois plus de solution de β glycérophosphate de sodium à 0,7 mg. de phosphore par cm^3 , et enfin l'eau distillée nécessaire pour obtenir une dilution au $1/10^{\circ}$ de la macération. On effectue parallèlement un mélange identique dans lequel on ajoute la quantité de solution de $\text{SO}_4 \text{ Mg M}/10$ nécessaire pour que la concentration du milieu en ion Mg^{++} soit de $\text{M}/100$. Chacun de ces mélanges est ajusté au pH 9 par l'addition de quelques gouttes de solution N de Na OH , et il est ensuite réparti en 12 tubes.

On prélèvera immédiatement dans l'un de ces tubes 1 cm^3 qui sera traité par 2 cm^3 d'acide trichloracétique à 20 %. Il représente le témoin qui indiquera la quantité d'acide phosphorique libéré, à la température du laboratoire, au cours des manipulations obligatoires (un quart d'heure environ). Les autres tubes sont portés à l'étuve, après avoir été amenés rapidement à la température de 37° grâce à l'immersion dans de l'eau à 50° .

A intervalles de temps réguliers, un tube est retiré de l'étuve; il est immédiatement refroidi et on effectue le prélèvement de 1 cm^3 de liquide qui sera traité par l'acide trichloracétique. Le dosage est fait selon la méthode décrite dans les techniques générales. A la quantité d'acide phosphorique trouvée on retranchera celle qui nous est indiquée par le témoin. On calculera ensuite la vitesse de réaction de la diastase, à

partir du moment où le milieu est amené à la température de 37°. Cette vitesse est donnée par la formule : $K = \frac{x}{t}$ x étant la quantité d'acide phosphorique (exprimée en mg. de phosphore) libérée pendant le temps d'étuve t (exprimé en minutes).

A) Cortico-surrénale

Nous avons utilisé la préparation d'organe frais obtenue dans les conditions habituelles, c'est-à-dire par macération d'une partie d'organe dans trois parties d'eau distillée. A cause de la grande activité de la diastase A_1 dans la cortico-surrénale, l'acide phosphorique a été dosé toutes les 10 minutes et le temps maximum d'hydrolyse n'a pas dépassé 2 heures.

On doit signaler que le témoin nous a indiqué une hydrolyse de près de 40 % de substrat, qui s'est faite à la température du laboratoire pendant le temps nécessaire aux manipulations déjà décrites. L'action de la diastase s'est donc manifestée avant que les tubes ne soient portés à 37°. Les quantités de $PO_4 H_3$ que nous avons mesurées sont celles qui sont libérées à partir du moment où les tubes sont portés à l'étuve.

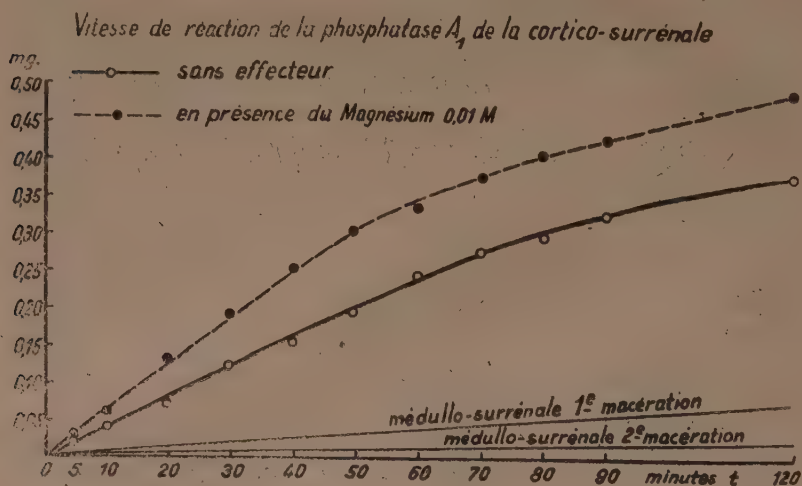
TABLEAU XXVI. — ($K = n \times 10^{-4}$)

		Temps en minutes :										
		5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120
Sans Mg :												
x		0,02	0,04	0,07	0,12	0,15	0,19	0,24	0,27	0,29	0,32	0,37
n		40	40	35	40	37	38	40	39	36	35	31
Avec Mg :												
x		0,03	0,06	0,13	0,19	0,25	0,30	0,33	0,37	0,40	0,42	0,48
n		60	60	65	63	62	60	55	53	50	46	40

Ce tableau nous indique que, pour le milieu sans magnésium, K est à peu près constant pour les temps qui vont de 5

à 70 minutes. La première partie de la courbe, représentant les variations de x en fonction de t , sera donc une droite. En ce qui concerne le milieu contenant du magnésium, K est une constante pendant les 50 premières minutes.

On remarque que la valeur de K est très différente en présence ou en l'absence de magnésium, ce métal ayant la propriété d'augmenter la vitesse de réaction de la diastase dans la proportion de $3/2$.



B) Médullo-surrénale

Ici les temps d'étuve furent beaucoup plus longs : de 2 à 24 heures, et l'acide phosphorique fut dosé toutes les deux heures.

1° La première expérience réalisée sur la médullo-surrénale porta sur les macérations habituellement utilisées, obtenues dans la proportion d'une partie d'organe frais pour trois parties d'eau distillée. Les témoins nous indiquent une hydro-

lyse de 25 %, donc notablement plus faible que dans le cas de la corticale. Cette première expérience nous donna les résultats suivants :

TABLEAU XXVII. — a) Unité de poids ($K = n \times 10^{-4}$)

Temps en minutes :

120 240 360 480 600 720 840 960 1.080 1.200 1.440

Sans Mg :

x	0,07	0,14	0,20	0,26	0,30	0,35	0,37	0,38	0,40	0,41	0,42
n	5,8	5,8	5,6	5,4	5,0	4,8	4,4	3,9	3,7	3,4	2,9

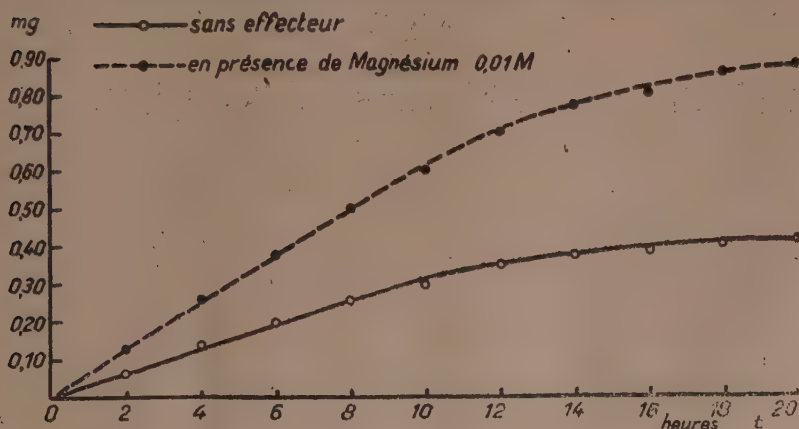
Avec Mg :

x	0,13	0,26	0,38	0,50	0,60	0,70	0,77	0,80	0,85	0,87	0,93
n	10,8	10,8	10,5	10,4	10,0	9,7	9,2	8,3	7,8	7,2	6,4

Ce tableau nous montre que, pendant les 10 premières heures, K est à peu près invariable, aussi bien dans le milieu qui ne contient pas d'ions Mg^{++} que dans celui qui en renferme. D'autre part, le magnésium double presque la vitesse de réaction de la diastase. Enfin, si l'on compare ces résultats avec ceux fournis par la cortico-surrénale, on remarque que K est

Vitesse de réaction de la phosphatase A_1 de la médullo-surrénale.

Macération contenant le même poids d'organe que celle de cortico-surrénale



7 fois plus faible pour le milieu sans magnésium, et il l'est 6 fois plus pour l'autre milieu.

2° Ensuite, nous avons voulu comparer l'activité d'une cortico-surrénale, à celle d'une médullo-surrénale. Nous avons tenu compte, non du poids de l'organe, mais de l'unité d'organe, et nous avons préparé une macération de médullo-surrénale qui contienne autant d'organes par unité de volume que la macération de cortico-surrénale précédemment étudiée. Sachant que 100 g. d'organes donnent après décortication 20 g. de médullaire pour 80 g. de corticale, nous avons mis à macérer ces 20 g. de médullaire, dans 240 cm³ d'eau, soit 3 fois 80 cm³. Cette préparation nous a fourni les résultats que voici :

TABLEAU XXVIII. — b) Unité d'organe ($K = n \times 10^{-4}$)

Temps en minutes :		120	240	360	480	600	720	840	960	1.080	1.200	1.440
Sans Mg :												
x	0,02	0,03	0,07	0,08	0,10	0,12	0,13	0,15	0,17	0,19	0,20	
n	1,7	2,1	1,9	1,7	1,7	1,7	1,5	1,6	1,6	1,6	1,4	
Avec Mg :												
x	0,04	0,09	0,14	0,16	0,22	0,24	0,28	0,33	0,38	0,42	0,48	
n	3,3	3,7	3,9	3,3	3,7	3,3	3,3	3,4	3,5	3,5	3,3	

Dans cette expérience, le témoin n'indiquait que 9 % de substrat hydrolysé.

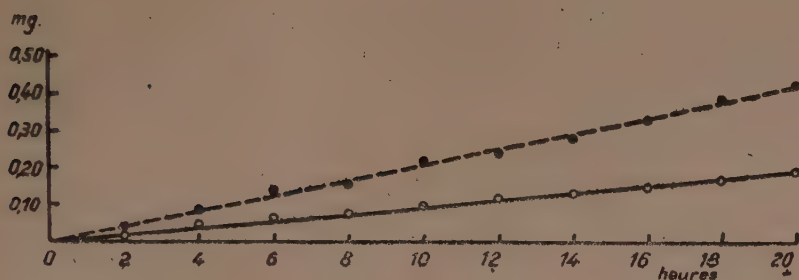
On remarque, dans le milieu contenant du magnésium comme dans celui qui n'en renferme pas, que la valeur de K est à peu près invariable. Ce sont donc deux droites qui représentent les variations de $x = f(t)$. Le magnésium a pour effet de doubler la vitesse d'hydrolyse, résultat déjà constaté dans l'expérience précédente. Enfin, la valeur de K est ici 24 fois plus faible que chez la cortico-surrénale, pour le milieu sans magnésium. En présence de ce métal, K est 18 fois plus faible.

Vitesse de réaction de la phosphatase A_1 de la médullo-surrénale.

Macération contenant le même nombre d'organes que celle de cortico-surrénale

—○— sans effecteur

---●--- en présence de Magnésium 0,01M



En résumé, dans les conditions bien déterminées que nous avons indiquées, la vitesse de réaction à la température de 37° de la diastase A_1 est 7 fois plus forte chez la cortico-surrénale que chez la médullo-surrénale, si l'on considère le poids de l'organe; mais elle devient 24 fois plus forte si l'on se rapporte à l'unité d'organe.

On peut déduire de ces résultats que les phénomènes de phosphorylation sont beaucoup plus importants au niveau de la partie corticale qu'à celui de la zone médullaire et ceci est à rapprocher du fait que les hormones cortico-surrénales jouent un rôle très important dans les processus de phosphorylation.

La cortico-surrénale est un organe beaucoup plus intéressant du point de vue phosphatasique que la médullo-surrénale; aussi, dans l'étude des effecteurs qui va suivre, nous nous sommes surtout attachés à examiner l'action de ces substances sur le système phosphomonoestérasique de la cortico-surrénale.

IV. — LES EFFECTEURS

Dans le premier chapitre de notre travail nous avons montré le rôle important que jouent les activateurs et les inhibiteurs dans les actions enzymatiques, et en particulier dans celles qui relèvent des phosphatases. Après avoir décrit le système phosphomonoestérasique de la cortico- et de la médullo-surrénale, l'étude des effecteurs de ce système s'impose.

Dans cette étude, nous nous restreindrons aux effecteurs des phosphomonoestérases de la cortico-surrénale. Seule l'adrénaline, à cause de son origine, a été examinée dans son action sur les phosphomonoestérases de la médullo-surrénale.

Nous étudierons successivement l'action de certains cathions (Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Cu^{++}), de quelques anions (F^{-} (COO_2^{-}), CN^{-}) et de diverses substances organiques (vitamine C, cholestérol, acide cholique, adrénaline).

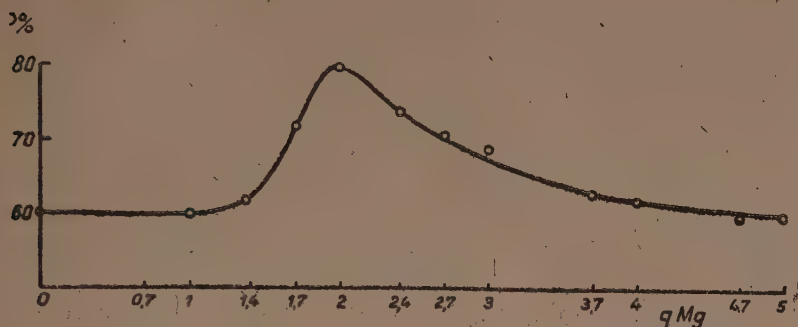
A) Les Cathions

1° Le Magnésium. — L'action du magnésium sur l'activité phosphomonoestérasique des divers systèmes étudiés a déjà été examinée en détail. Aussi nous nous contenterons de consigner ici l'expérience qui nous a permis de déterminer le q Mg optimum, qui nous donnait le maximum d'activation pour la phosphatase A_1 . Nous avons utilisé la macération fraîche dialysée de cortico-surrénale, et nous avons opéré à pH 9. L'hydrolyse a duré 2 heures :

TABLEAU XXIX

q Mg :											
0	1	1,4	1,7	2	2,4	2,7	3	3,7	4	4,7	5
% de substrat hydrolysé :											
60	60	62	72	80	74	71	69	64	62	60	60

Détermination du qMg optimum de la phosphomonoestérase A_1
de la cortico-surrénale.



Comme on le voit, c'est pour la valeur $qMg = 2$ que l'activation est maxima. C'est donc avec quelque raison que nous avons utilisé des solutions dans lesquelles l'ion Mg^{++} se trouvait à la concentration $M/100$.

2° Le Manganèse. — Le manganèse, dont l'action sur la phosphatase A_1 fut longtemps discutée, est considéré depuis les travaux de CLOETENS (1), BAMANN (2), MASSART et DUFAIT (3) comme activateur de cette diastase. C'est, après le magnésium, le métal dont l'action effectrice est le mieux connue; aussi son étude se place-t-elle tout naturellement après celle de l'ion Mg^{++} .

Nous avons utilisé une solution $M/10$ de $SO_4 Mn$ laquelle, diluée au $1/10^e$ dans le milieu, nous donnait en fin de compte une concentration en ions Mn^{++} égale à $M/100$. L'action de ce métal fut étudiée d'abord sur la macération d'organe frais, ensuite sur la macération de poudre acétonique.

(1) CLOETENS (R.). — *Naturw.*, 1939, 27, 806, cc. 1940, 1, 392.

(2) BAMANN (E.). — *Naturw.*, 1940, 28, 142 et *ibid.*, 3, 405.

(3) MASSART (L.) et DUFAIT (R.). — *Naturw.*, 1939, 27, 806, cc. 1940, 1, 393.

Pour chacune de ces macérations nous avons examiné l'action du manganèse sur l'activité phosphatasique aux valeurs de pH correspondant aux maximums. Pour le produit frais, les résultats obtenus furent les suivants :

TABLEAU XXX

48 heures d'hydrolyse :				2 heures d'hydrolyse :			
Sans Mn		Avec Mn		Sans Mn		Avec Mn	
pH	P %	pH	P %	pH	P %	pH	P %
3,5	43	3,6	38	8,8	64	8,7	69
3,7	50	3,8	46	8,9	64	8,9	72
3,9	48	4,1	40	9,1	67	9,2	75

On remarque d'emblée une inhibition très faible de la phosphatase A_3 et une activation assez forte de la phosphatase A_1 .

Pour le produit acétonique les résultats furent différents :

TABLEAU XXXI

48 heures d'hydrolyse :				2 heures d'hydrolyse :			
Sans Mn		Avec Mn		Sans Mn		Avec Mn	
pH	P %	pH	P %	pH	P %	pH	P %
3,7	18	3,5	12	8,7	22	8,9	23
3,9	16	3,8	17	9	25	9,1	28
4	16	4,1	14	9,2	28	9,3	26

Ici on ne remarque ni activation, ni inhibition : le manganèse paraît sans action.

L'ion Mn^{++} , signalé par BAMANN (1) comme un activateur plus puissant que l'ion Mg^{++} de la phosphatase A_1 dans des préparations de foie, de rein et de rate, nous apparaît dans la macération de cortico-surrénale fraîche comme activateur plus faible que le magnésium. Mais son action est tout de même analogue à celle de l'ion Mg^{++} , si elle est plus faible : activateur de A_1 , le manganèse est inhibiteur de A_3 .

(1) BAMANN (E.). — *Naturw.*, 1940, 28, 142 et *ibid.*, 3, 405.

Quant à l'inactivité de l'ion Mn^{++} sur les macérations de poudre acétonique, ce fait confirme les expériences d'ALBERS (1) qui n'a pas retrouvé d'action du manganèse sur des préparations enzymatiques de rein purifiées.

3° Le Zinc. — Nous avons ensuite examiné l'action du zinc sur l'activité phosphomonoestérasique de la macération fraîche de cortico-surrénale. Le sel utilisé a été encore le sulfate, et la concentration finale du milieu en ions Zn^{++} était encore M/100. Nous avons d'abord étudié l'action du zinc sur la zone basique (2 heures d'hydrolyse) :

TABLEAU XXXII

Sans Zn :						
pH	7,2	7,8	8,4	9,1	9,5	10
P %	20	31	50	65	55	18
Avec Zn :						
pH	7,2	8	8,5	9,1	9,6	10,2
P %	11	13	15	17	12	6

Ces résultats nous montrent que la phosphatase A_1 est inhibée très fortement par le zinc à la concentration pour laquelle le magnésium nous donne l'activation optima.

En zone acide, nos expériences se limitèrent au seul pH optimum de la phosphatase A_3 : pour un pH 3,7, après 48 heures d'étuve à 37°, le pourcentage de substrat hydrolysé est de 50 pour le milieu exempt de zinc, et il n'est plus que de 16 après addition de SO_4Zn .

Le zinc à la concentration M/100 possède une action inhibitrice nette sur les phosphomonoestérases de la cortico-surrénale. Cette action est uniforme, le zinc paraissant inhiber de la même manière la phosphatase A_1 et la phosphatase A_3 .

(1) ALBERS (D.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1940, 266, 1.

4° Le Cuivre. — Le cuivre à la concentration de M/100 provoque une très forte inhibition de la phosphatase A_1 , dans les macérations de cortico-surrénale fraîche et une inhibition totale de la phosphatase A_3 . Le sel utilisé est toujours le sulfate. Voici les résultats :

TABLEAU XXXIII

24 heures d'hydrolyse :				2 heures d'hydrolyse :			
Sans Cu		Avec Cu		Sans Cu		Avec Cu	
pH	P %	pH	P %	pH	P %	pH	P %
3,8	41	3,7	0	9,1	54	9,1	10
4	38	3,8	0	9,2	55	9,2	10

B) Les Anions

1° Le Fluorure. — Les fluorures alcalins étant signalés par les auteurs comme inhibiteurs, surtout des phosphatases acides, nous avons examiné l'action du fluorure de sodium sur l'activité phosphatasique des macérations fraîches de cortico-surrénale.

En zone acide (24 heures d'hydrolyse), FNa utilisé à la concentration M/100 provoque une inhibition très nette de la phosphatase A_3 :

TABLEAU XXXIV

Sans F :

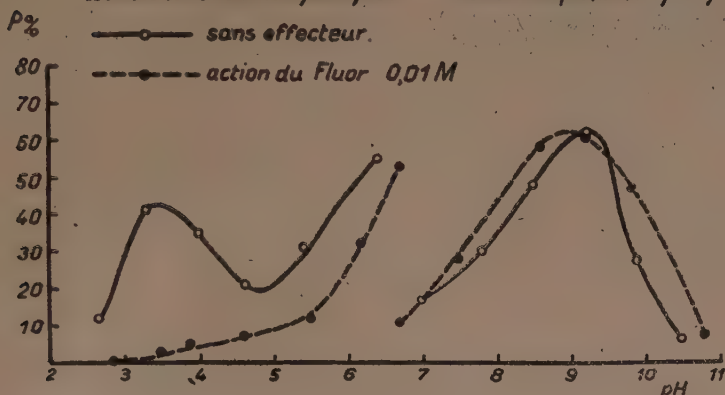
pH	2,7	3,3	4	4,7	5,4	6,4
P %	12	41	35	21	31	55

Avec F :

pH	2,9	3,5	3,9	4,6	5,5	6,2	6,7
P %	1	3	5	7	12	32	53

Action de l'ion Fluor sur le système phosphomonoestérasique de la cortico-surrénale (organe frais).

Zone acide : 24 h. d'hydrolyse. Zone basique : 2 h. d'hydrolyse.



En zone basique (2 heures d'hydrolyse), le fluorure paraît sans action sur la phosphatase A_1 :

TABLEAU XXXV

Sans F :						
pH	7	7,8	8,5	9,2	9,9	10,5
P %	17	30	48	62	28	7
Avec F :						
pH	6,7	7,5	8,6	9,2	9,8	10,8
P %	11	28	58	61	47	8

Dans les préparations de cortico-surrénale fraîche, l'ion F^- exerce une action inhibitrice très forte sur la phosphatase très acide, action inhibitrice mise en évidence dans d'autres organes par INOUE (1). D'autre part, la phosphatase A_1 n'est pas touchée par le fluorure, comme l'ont montré BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI (2) d'une part et MUNEMURA (3) d'autre part dans le rein et le sérum.

(1) INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, 7, 433.

(2) BELFANTI (S.), CONTARDI (A.), ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, 29, 842.

(3) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

2° L'Oxalate. — Les oxalates alcalins sont signalés comme inhibiteurs plus généraux et plus forts des phosphatases alcalines que les fluorures. L'action de l'oxalate de potassium, à la concentration M/100, fut étudiée autant sur la diastase A_1 que sur la phosphatase A_3 de la cortico-surrénale (produit frais) :

TABLEAU XXXVI

24 heures d'hydrolyse :				2 heures d'hydrolyse :			
Sans $(\text{COO})_2$		Avec $(\text{COO})_2$		Sans $(\text{COO})_2$		Avec $(\text{COO})_2$	
pH	P %	pH	P %	pH	P %	pH	P %
3,6	41	3,5	4	8,8	50	8,7	45
3,8	46	3,8	5	9	57	9,2	57
4	42	4,1	5	9,4	58	9,5	55

Les résultats obtenus nous montrent, comme dans le cas des fluorures, une inhibition très forte de la phosphatase très acide, et une action nulle sur la phosphatase A_1 . On doit rapprocher la cortico-surrénale du foie et du rein, pour lesquels BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI (1) ont signalé que la phosphatase A_1 n'était pas influencée par les oxalates: et on doit séparer la phosphatase A_1 de la cortico-surrénale, de celle du sérum et de celle de l'os qui sont inhibées par les oxalates (mêmes auteurs).

3° Le Cyanure. — Nous avons examiné l'action de CNK M/100 sur les phosphatases A_1 et A_3 de la cortico-surrénale (produit frais) :

TABLEAU XXXVII

24 heures d'hydrolyse :				2 heures d'hydrolyse :			
Sans CN		Avec CN		Sans CN		Avec CN	
pH	P %	pH	P %	pH	P %	pH	P %
3,7	39	3,7	20	8,7	46	8,9	57
3,9	39	3,9	25	8,9	52	9	59
4	38	4,1	22	9,2	59	9,2	62

(1) BELFANTI (S.), CONTARDI (A.), ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, 29, 517.

Nous remarquons une inhibition faible de A_3 , et une action à peu près nulle sur la phosphatase alcaline. Nous ne retrouvons pas ici l'action inhibitrice du cyanure que MASSART et DUFAYT (1) ont signalé sur la phosphatase alcaline du rein et de la levure.

C) Les Substances organiques

1° La Vitamine C. — Les divers auteurs qui ont étudié l'action de la vitamine C sur les phosphatases n'ont pas abouti à des conclusions bien nettes : les effets de ce corps sont encore incertains.

Il nous a paru intéressant d'examiner l'effet de l'acide ascorbique sur les phosphatases de la cortico-surrénale, en raison de la richesse naturelle de cet organe en vitamine C. Nous avons d'abord pensé que l'acide ascorbique pouvait être l'activateur naturel qui était enlevé par l'acétone. Aussi, nous avons étudié son action, à la fois sur la macération d'organe frais, et sur celle de la poudre acétonique.

La vitamine C est introduite dans le milieu sous forme de solution aqueuse préparée au moment de l'emploi, et dont le pH est ramené au pH optimum d'hydrolyse. Nous avons opéré au pH 8,9 et le temps d'hydrolyse a été de deux heures. Les quantités d'acide ascorbique introduites varient de 0 mgr. à 50 mgr. pour un volume total de 5 cm³ (correspondant à 0,5 cm³ de macération).

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XXXVIII

Acide ascorbique (mg. pour 5 cc.)	0	1	5	10	25	50
P % Produit frais	53	53	57	59	56	54
P % Produit acétonique	32	33	33	35	31	29

(1) MASSART (L.) et DUFAYT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, 272, 157.

L'action de la vitamine C paraît assez faible. Il semblerait que ce corps exerce une légère activation qui atteint son maximum pour la concentration de 10 mg. pour 5 cm³. Pour des concentrations supérieures l'effet deviendrait inhibiteur. De toutes façons, on ne constate pas plus d'action sur la poudre acétonique que sur le produit frais. L'acide ascorbique n'est pas l'activateur qui est enlevé par l'acétone.

Après avoir examiné l'action comparée de la vitamine C sur le produit frais et sur la poudre acétonique, au pH optimum de la phosphatase A₁, nous avons étudié les effets de ce produit, seul et en présence de cuivre, à la fois sur la phosphatase A₁ et sur la diastase A₃ dans le produit frais seulement. Le cuivre, introduit à des doses très faibles (10 γ), doses auxquelles il est sans action, favorise l'auto-oxydation de la vitamine C en acide déhydro-ascorbique. On étudie ainsi comparativement les effets de l'acide ascorbique et de son produit d'oxydation.

Avec la phosphomonoestérase alcaline (2 heures d'hydrolyse), voici les résultats obtenus :

TABLEAU XXXIX

Acide ascorbique (mgr. pour 5 cc.)	0	1	5	10	25	50
P % Sans Cu	58	59	58	65	63	62
P % Avec 10 γ Cu	60	60	63	63	63	58

On retrouve des résultats analogues à ceux du tableau précédent, et l'addition de cuivre n'amène pas de changement. A pH 3,6, après 48 heures d'hydrolyse, nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XL

Acide ascorbique (mgr. pour 5 cc.)	0	1	5	10	25	50
P % Sans Cu	46	46	45	28	18	13
P % Avec 10 γ Cu	47	38	31	22	17	15

Nous remarquons que la vitamine C exerce une action inhibitrice nette sur la phosphatase très acide; cette action croît avec la concentration. L'acide déhydroascorbique semble exercer une inhibition plus marquée que la vitamine C, et cet effet se fait sentir pour de plus faibles concentrations.

En résumé, on peut dire que la vitamine C, sans action appréciable sur la phosphatase alcaline de la cortico-surrénale, exerce sur la phosphatase A₃ du même organe une inhibition renforcée par la présence de traces de cuivre.

2° Le Cholestérol. — La cortico-surrénale renferme de 34 à 56 pour mille de cholestérol. Il semble donc intéressant d'étudier l'action effectrice de ce corps sur l'activité phosphomonoestérasique de l'organe frais d'une part, de la poudre acétonique d'autre part. Mais une difficulté se présente : le cholestérol est insoluble dans l'eau. Nous avons réalisé une solution de ce corps dans l'alcool à 95° et nous avons introduit cette solution dans le milieu aqueux. Le cholestérol précipite, mais reste à l'état d'émulsion excessivement fine.

Nous avons utilisé une quantité de cholestérol correspondant à celle qui existe naturellement dans l'organe. Un témoin avec la même quantité d'alcool et sans cholestérol a été réalisé. L'hydrolyse (2 heures) a été effectuée au pH 9 :

TABLEAU XLI

Produit frais : pH = 9			Produit acétonique : pH = 9,1		
Alcool	Cholestérol	P %	Alcool	Cholestérol	P %
0 cc. 5	32 0/00		0 cc. 5	32 0/00	
+	+	50	+	+	22
+	0	53	+	0	22
0	0	64	0	0	24

On remarque une inhibition assez nette dans le cas du produit frais, à peine marquée pour la poudre acétonique. Mais

cette inhibition paraît due à la présence d'alcool. L'insolubilité du cholestérol est peut-être un obstacle à l'étude de son action.

3° L'Acide cholique. — L'acide cholique est inhibiteur de la phosphatase A_1 du rein et de l'os, mais non de celle de l'intestin (1-2). Pour A. LAURENS (3), « la sensibilité des phosphatases des divers organes à l'acide cholique n'est pas identique; mais il semble qu'il s'agit là de différence de degré et non de nature ».

L'action de l'acide cholique fut examinée sur les deux phosphomonoestérases de la cortico-surrénale dans le produit frais. Ce corps est dissous dans de l'eau légèrement alcalinisée, et la solution est ensuite ramenée aux environs de la neutralité. Les concentrations en acide cholique varient de 0 à M/100. Pour la phosphatase alcaline l'hydrolyse a duré 2 heures; elle a été de 24 heures pour la diastase très acide.

Les résultats ont été les suivants :

TABLEAU XLII

Concentration en acide cholique	0	M/2.000	M/1.000	M/500	M/250	M/100
pH = 3,75 24 h. P %	46	46	45	44	43	30
pH = 9 2 h. P %	75	75	73	71	69	66

Ce tableau nous montre une action inhibitrice assez nette de l'acide cholique, action qui augmente avec la concentration. L'effet inhibiteur est plus évident pour la phosphatase très acide que pour la diastase A_1 . Celle-ci, plus inhibée par l'acide cholique que la phosphatase intestinale, l'est beaucoup moins que l'enzyme du rein, du foie ou de l'os.

(1) BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, 118, 341.

(2) TAKATA. — Cité d'après OPEENHEIMER (C.) : Supplément Lief 1 et 2. W. Junck, éd., La Haye, 1935, 98, 170.

(3) LAURENS (A.). — *Thèse doct. Pharm.* Marseille, 1942.

4° L'Adrénaline. — Nous savons que les capsules surrénales doivent le rôle important qu'elles jouent dans l'organisme, à leurs hormones : d'une part, l'adrénaline pour la zone médullaire et, d'autre part, la désoxycorticostérone pour la région corticale. Aussi nous avons voulu terminer l'étude des effecteurs en examinant l'action de ces deux hormones.

L'adrénaline a été étudiée dans ses effets sur les phosphomonoestérases de la cortico-surrénale et de la médullo-surrénale, et chaque fois sur le produit frais.

La solution d'adrénaline utilisée n'est autre que la solution au 1/1000° du Codex, et les concentrations que nous avons employées vont de 0 à 1 mgr. pour 5 cm³. Pour la cortico-surrénale, les temps d'hydrolyse ont été de 2 heures pour la diastase A₁, et de 24 heures pour la phosphatase A₃ :

TABLEAU XLIII

Adrénaline (mgr. pour 5 cc.).	0	0,10	0,25	0,50	0,75	1
pH = 3,7 24 h. P %	37	32	31	29	26	21
pH = 9 2 h. P %	55	58	59	60	61	61

Les résultats obtenus indiquent une inhibition très nette de la phosphatase très acide par l'adrénaline. Au contraire, la diastase A₁ n'est pas inhibée, elle paraît même légèrement activée.

Avec la médullo-surrénale, les temps d'hydrolyse furent de 12 heures pour les deux diastases :

TABLEAU XLIV

Adrénaline (mgr. pour 5 cc.)	0	0,10	0,25	0,50	0,75	1
pH = 3,9 12 h. P %	22	19	18	18	15	15
pH = 9 12 h. P %	38	42	45	50	43	40

On constate, comme dans le cas de la cortico-surrénale, une inhibition marquée de la phosphatase A₃. Quant à la diastase alcaline, elle paraît ici nettement plus activée.

L'adrénaline, inhibiteur de la phosphatase très acide, paraît activer la phosphomonoestérase A_1 , et cette dernière action est plus nette chez la médullo-surrénale.

5° La Désoxycorticostérone. — Nous n'avons pu nous procurer cette hormone que sous la forme commerciale que Roussel livre sous le nom de « Syncortyl ». Ce sont des ampoules de 1 cm³ renfermant 10 milligrammes d'acétate de désoxycorticostérone, en solution huileuse.

Cette solution est mise en émulsion dans le milieu expérimental. On étudie l'action du « Syncortyl » sur la phosphatase alcaline de la cortico-surrénale, dans la macération d'organe frais et dans celle de la poudre acétonique. On opère à pH 9, le temps d'hydrolyse est de 2 heures. Les doses d'hormone utilisées varient de 0 à 1 mg. par 5 cm³ (correspondant à 0,5 cm³ de macération) :

TABLEAU XLV

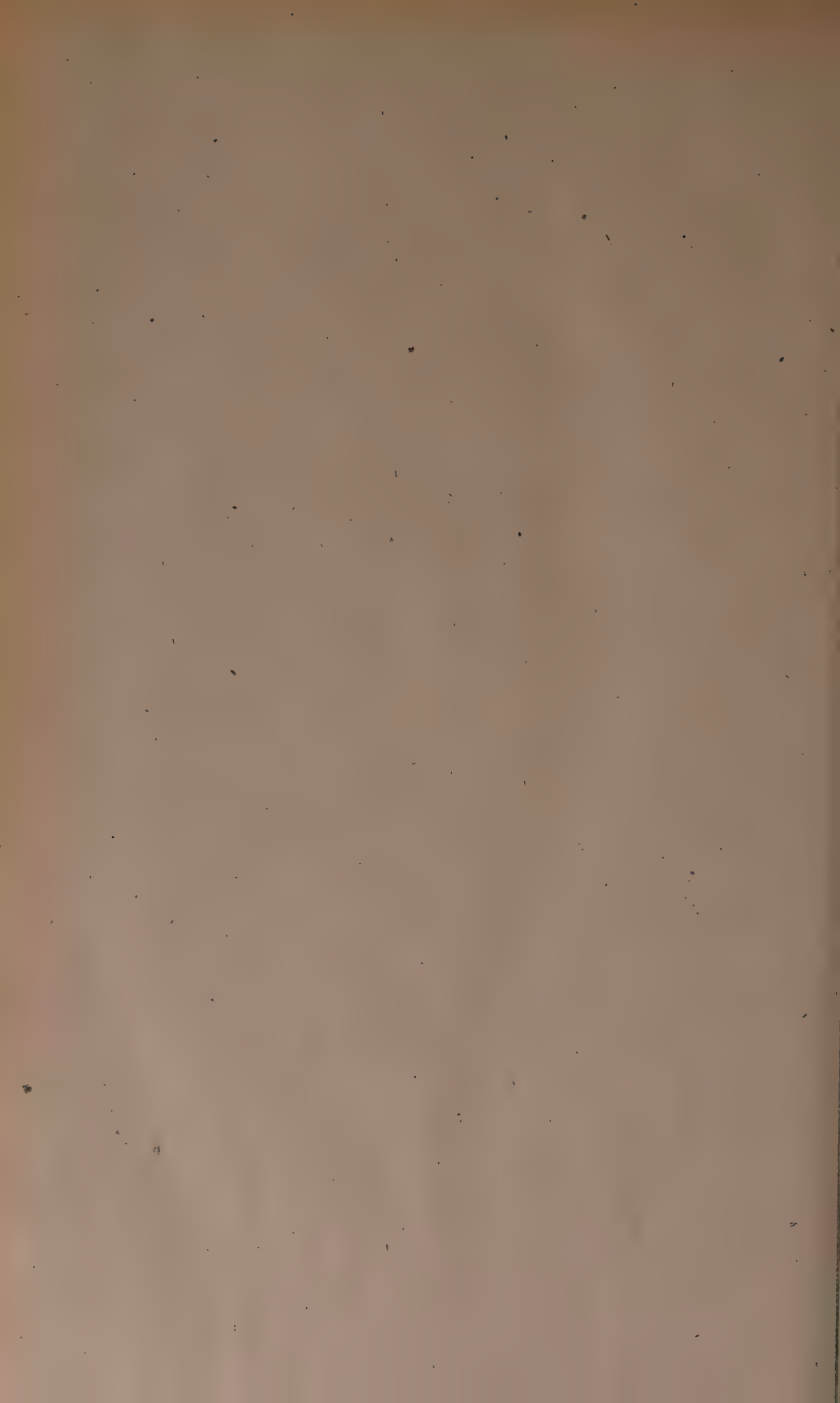
Syncortyl (mgr. pour 5 cc.) . .	0	0,16	0,33	0,50	0,66	1
Produit acétonique P %	27	29	27	28	29	29
Produit frais P %	52	56	53	57	57	55

Il ne semble pas que l'hormone cortico-surrénale exerce une action quelconque sur l'activité phosphatasique de la diastase A_1 , aussi bien dans le produit frais que dans la poudre acétonique. Mais il ne faut pas attacher à ces résultats une très grande valeur, car l'hormone introduite dans le milieu reste vraisemblablement en solution dans l'huile et, malgré l'émulsion de celle-ci, se trouve dans de mauvaises conditions pour influencer sur le phénomène diastasique.

*
**

En résumé, toutes les substances que nous venons d'étudier

se sont montrées inhibitrices de la diastase A_3 , alors que seuls le zinc, le cuivre et l'acide cholique inhibent la phosphatase A_1 . En plus du magnésium, le manganèse et l'adrénaline sont les seuls corps dont nous avons pu constater l'action activatrice nette sur la phosphatase alcaline, toutes les autres substances étant pratiquement sans effet sur elle.



CHAPITRE IV

LES AUTRES SYSTÈMES PHOSPHATASIQUES

Après les phosphomonoestérases, ce sont les pyrophosphatases qui sont les mieux connues. Aussi est-ce le système pyrophosphatasique de la cortico et de la médullo-surrénale qui a retenu notre attention assez longtemps. Nous avons ensuite recherché dans ces organes les diestérases, les métaphosphatases et les phytinases.

I. — LES PYROPHOSPHATASES

Nous avons examiné le système pyrophosphatasique de la cortico-surrénale, et celui de la médullo-surrénale, dans les macérations d'organe frais et de poudre acétonique. Ensuite, nous avons étudié l'action de quelques effecteurs de ce système. Nous savons qu'il existe dans les organes animaux trois types de pyrophosphatases, l'un (très acide) dont le pH optimum est de 3,8-4, le deuxième (acide) qui agit électivement à pH 5,2-5,5 et enfin un troisième type (alcalin) dont le pH opti-

mum est de 7,8-8. D'après J. DURAND (1) on retrouverait ces trois types dans tous les organes animaux.

Les expériences que nous avons réalisées sur les pyrophosphatases ont comporté des temps courts d'hydrolyse : une heure ou deux heures. L'activité de ces diastases est assez importante pour qu'un temps court d'étuve à 37° fournisse une hydrolyse suffisante.

A) Cortico-surrénale

1° Produit frais. — L'activité pyrophosphatasique en fonction du pH a d'abord été étudiée sur la macération de cortico-surrénale fraîche. Nous avons réalisé une hydrolyse d'une heure, puis, pour contrôler ces premiers résultats, nous avons poursuivi l'hydrolyse pendant deux heures.

Le substrat utilisé est le pyrophosphate de sodium dont nous avons employé une solution dosée à 0,7 mg. de phosphore par centimètre cube. Ici également les résultats que nous consignons dans nos tableaux sont les chiffres moyens des résultats d'expériences répétées :

TABLEAU XLVI

1 heure d'hydrolyse :												
pH	2,9	3,4	3,9	4,8	5,3	6,0	6,5	7,2	7,7	8,1	8,9	9,7
P %	9	27	28	14	12	9	5	10	16	19	10	0
2 heures d'hydrolyse :												
pH	2,8	3,5	3,9	4,8	5,7	6,5	7,1	7,6	8,1	8,9	9,4	10,2
P %	7	49	39	30	26	24	27	27	32	27	20	0

Ce tableau fait apparaître deux maximums bien nets, pour une hydrolyse d'une heure, l'un à pH 3,4-3,9, l'autre à

(1) DURAND (J). — *Thèse doct. Pharm.*, Marseille, 1943.

pH 8,1. Ces deux maximums se retrouvent au bout de deux heures d'hydrolyse.

2° Poudre acétonique. — L'activité de la poudre acétonique de cortico-surrénale étant beaucoup plus faible que celle du produit frais, nous n'avons pas obtenu de résultats appréciables au bout d'une heure d'hydrolyse. Après deux heures d'étuve à 37°, les résultats, encore faibles, sont tout de même assez nets :

TABLEAU XLVII

pH	2,6	3	3,9	4,4	5,2	6	6,8	7,4	8	8,5	9,1	9,7
P %	2	4	10	8	5	4	6	7	9	10	5	1

On voit apparaître avec la poudre acétonique comme avec le produit frais deux maximums : l'un à pH 3,9, l'autre à pH 8-8,5.

Il semble donc que la cortico-surrénale possède deux pyrophosphatases : l'une très acide (pH optimum 3,8-4) et l'autre alcaline (pH optimum 7,8-8). Cet organe ne paraît pas renfermer la pyrophosphatase acide (pH optimum 5,2-5,5).

Le traitement par l'acétone diminue considérablement l'activité pyrophosphatasique de la cortico-surrénale.

B) Médullo-surrénale

1° Produit frais. — Comme dans l'étude de la cortico-surrénale nous avons réalisé ici deux temps courts d'hydrolyse : une heure et deux heures :

XLVIII

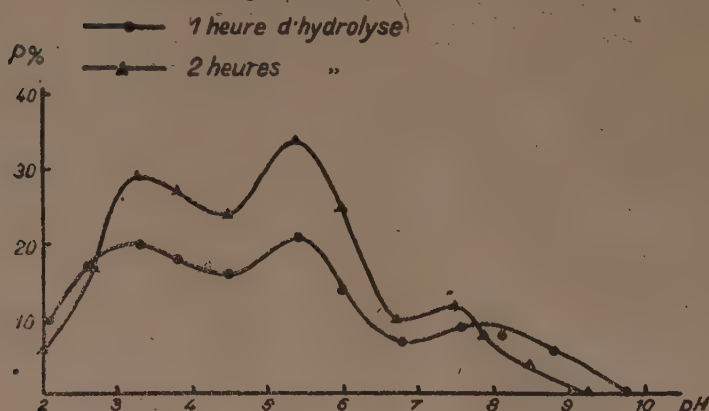
1 heure d'hydrolyse :

pH	2,1	2,6	3,3	3,8	4,5	5,4	6	6,8	7,6	8,1	8,8	9,8
P %	10	17	20	18	16	21	14	7	9	8	6	0

2 heures d'hydrolyse :

pH	2	2,7	3,3	3,8	4,5	5,4	6	6,7	7,5	7,9	8,5	9,3
P %	6	17	29	27	24	34	25	10	12	8	4	0

Le système pyrophosphatasique de la médullo-surrénale (organe frais)



Ce tableau montre trois maximums, aussi bien après une heure qu'après deux heures d'étuve à 37°; le premier à pH 3,3-3,8, le second à pH 5,4 et le dernier à pH 7,5-7,6, celui-ci beaucoup plus faible que les deux autres et à peine marqué.

2° Poudre acétonique. — La poudre acétonique de médullo-surrénale possède une activité pyrophosphatasique beaucoup plus faible que le produit frais. Néanmoins, nous avons pu constater de petites variations dans les chiffres obtenus après une heure d'hydrolyse :

TABLEAU XLIX

1 heure d'hydrolyse :

pH	2	3,3	3,8	4,5	5,3	6	6,5	7,1	7,9	8,5	9	9,8
P %	3	8	6	5	6	3	2	3	4	4	2	0

2 heures d'hydrolyse :

pH	2	3,3	3,8	4,5	5,3	6	6,5	7,1	7,9	8,5	9	9,8
P %	4	14	18	12	15	10	8	8	10	8	6	2

Nous remarquons ici comme dans le tableau précédent trois

maximums (pH 3,3-3,8, pH 5,3, pH 7,9), mais l'activité est bien diminuée.

La médullo-surrénale, à l'inverse de la cortico-surrénale, paraît posséder les trois pyrophosphatases signalées par TAKAHASHI (1) et MUNEMURA (2), la diastase alcaline étant toutefois beaucoup moins active que les deux autres.

Le traitement par l'acétone amène ici également une baisse de l'activité pyrophosphatasique.

C) Les Effecteurs des Pyrophosphatases

Pour compléter et préciser l'étude des systèmes pyrophosphatasiques de la cortico- et de la médullo-surrénale, nous avons examiné l'action sur ces systèmes de quelques substances.

1° Le Magnésium. — Le premier des effecteurs étudiés fut évidemment le magnésium. Son action fut examinée sur les systèmes pyrophosphatasiques des deux organes (macérations fraîches), à la concentration M/100 en $\text{SO}_4 \text{ Mg}$.

a) *Cortico-surrénale.* — La macération de cortico-surrénale fraîche ayant agi à divers pH sur le pyrophosphate de Na, en présence et en l'absence de magnésium, nous donna après une heure d'étuve à 37° les pourcentages suivants :

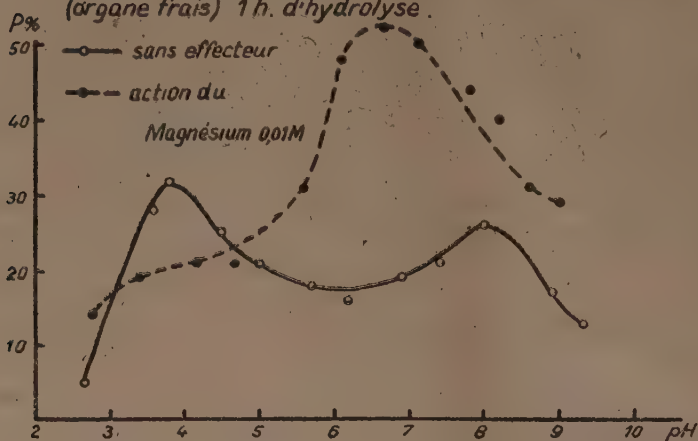
TABLEAU L

Sans Mg :													
pH	2,7	3,6	3,8	4,5	5	5,7	6,2	6,9	7,4	8	8,9	9,3	
P %	5	28	32	25	21	18	16	19	21	26	17	13	
Avec Mg :													
pH	2,8	3,4	4,1	4,7	5,6	6,1	6,7	7,1	7,8	8,2	8,6	9	
P %	14	19	21	21	31	48	52	50	44	40	31	29	

(1) TAKAHASHI, — *J. Biochem. Japan*, 1932, 16, 447.

(2) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

Le système pyrophosphatasique de la cortico-surrénale.
(organe frais) 1 h. d'hydrolyse.



On ne retrouve plus dans le produit contenant du magnésium les deux maximums à pH 3,8 et à pH 8 du milieu sans magnésium. L'allure de la courbe est même totalement différente : on observe un seul maximum et pour le pH 6,7; or on n'a jamais signalé de pyrophosphatase à pH optimum 6,7.

Comment peut-on interpréter ce changement dans l'allure de la courbe de l'activité pyrophosphatasique en fonction du pH?

Il semble d'abord que le magnésium exerce une inhibition sur la pyrophosphatase très acide. En effet, pour le pH 3,8-4 le pourcentage de substrat hydrolysé tombe de 32 à 21. La pyrophosphatase très acide serait inhibée par l'ion Mg^{++} , comme la phosphomonoestérase très acide. Ensuite, on remarque une activation très nette par l'ion Mg^{++} de la pyrophosphatase alcaline; au pH 8, le pourcentage passe de 26 à 40. Le magnésium exerce sur la pyrophosphatase alcaline une

action identique à celle qui a été observée sur la diastase A₁.

Mais cela n'explique pas le maximum en 6,7. J. DURAND (1), indique, dans les conclusions de son travail sur les pyrophosphatases, que les trois diastases qui semblent exister dans tous les tissus animaux n'apparaissent pas toujours d'emblée, et que, pour les mettre en évidence, on est obligé d'avoir recours à des effecteurs. Dans ce cas, si on admet que la cortico-surrénale renferme la pyrophosphatase acide, inapparente dans la macération fraîche en l'absence d'effecteur, et que cette diastase est activée par l'ion Mg^{++} , on comprend alors que le maximum observé au pH 6,7 provient simplement de la fusion des maximums des deux phosphatases voisines (pH optimums 5,5 et 8), activées toutes les deux par le magnésium.

Une preuve à l'appui de cette hypothèse est apportée par l'étude de l'action du magnésium sur les pyrophosphatases de la médullo-surrénale.

b) *Médullo-surrénale*. — L'étude de l'action de l'ion Mg^{++} a porté uniquement sur les pH optimums des trois pyrophosphatases. La macération d'organe frais, après une heure d'hydrolyse, nous fournit les résultats suivants :

TABLEAU LI

Sans Mg :							
pH	4	4,2	5,3	5,5	7,8	8	
P %	18	16	20	18	10	9	
Avec Mg :							
pH	4	4,2	5,3	5,5	7,8	8	
P %	13	12	38	41	32	30	

Ce tableau nous montre que le magnésium exerce un effet inhibiteur sur la pyrophosphatase très acide, et un effet acti-

(1) DURAND (J.). — *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1943.

vateur sur les deux autres diastases. Ces résultats sont à rapprocher de ceux qui ont été constatés chez la cortico-surrénale. Le magnésium paraît être inhibiteur de la pyrophosphatase très acide (pH optimum 3,8-4) et activateur des pyrophosphatases acide (pH optimum 5,2-5,5) et alcaline (pH optimum 7,8-8).

Grâce à son action activatrice sur la pyrophosphatase acide, le magnésium nous a permis de mettre en évidence cette phosphatase dans les macérations de cortico-surrénale fraîche.

2° Le Zinc. — Nous avons étudié l'action de ce métal sur l'activité pyrophosphatasique de la cortico-surrénale (produit frais). On emploie une solution de SO_4Zn et la concentration en Zn^{++} sera toujours de M/100. Après une heure d'hydrolyse, les résultats furent les suivants :

TABLEAU LII

Sans Zn :												
pH	2,9	3,4	3,9	4,8	5,3	6	6,5	7,2	7,7	8,1	9,7	10,3
P %	9	27	28	14	12	9	5	10	16	19	10	0
Avec Zn :												
pH	2,7	3,5	4,1	4,7	5,1	5,5	5,7	6,3	7,4	7,9	8,1	8,6
P %	2	2	3	4	4	4	4	2	4	6	8	5

On constate une inhibition presque totale de l'activité pyrophosphatasique en milieu acide. Cet effet est moins fort dans la zone basique; néanmoins la pyrophosphatase alcaline perd plus de 50 % de son activité.

Le zinc, à la concentration q $\text{Zn} = 2$, apparaît comme un inhibiteur général des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases. Dans le cas particulier des pyrophosphatases, l'action du zinc est plus nette dans la zone acide.

3° Le Fluorure. — Nous avons examiné l'action du fluorure de sodium sur l'activité pyrophosphatasique de la cortico-sur-

rénale (produit frais). Le fluorure est encore utilisé à la concentration M/100, et le temps d'hydrolyse a été d'une heure :

TABLEAU LIII

Sans F :

pH	2,7	3,6	3,8	4,5	5	5,7	6,2	6,9	7,4	8	8,9	9,3
P %	5	28	32	25	21	18	16	19	21	26	17	13

Avec F :

pH	2,7	3,9	4,5	5,1	5,6	6,3	6,9	7,6	7,9	8,4	8,9	9,4
P %	2	4	7	3	5	3	10	14	24	24	15	4

Les résultats obtenus montrent que le fluorure de sodium, à la concentration M/100, exerce un effet inhibiteur très marqué sur les pyrophosphatases acides; par contre la distance alcaline ne paraît pas touchée. Ces résultats sont analogues à ceux que nous obtenions dans l'étude du système phosphomonoestérasique.

Les fluorures sont inhibiteurs des phosphatases acides de la cortico-surrénale et ils sont sans action sur les diastases alcalines de cet organe.

4° **Le Cyanure.** — Nous avons étudié l'action de CNK à la concentration M/100 sur les trois pyrophosphatases de la cortico-surrénale, dans la macération d'organe frais. Après une heure d'hydrolyse, nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU LIV

Sans CN :

pH	3,8	4		5,3	5,6		8	8,1
P %	20	22		19	18		22	19

Avec CN :

pH	3,9	4		5,3	5,6		8	8,1
P %	19	20		18	18		20	19

Ce tableau n'indique ni activation, ni inhibition.

Alors que nous avons constaté une nette inhibition de la

phosphomonoestérase acide par l'ion CN^- , celui-ci paraît sans action sur toutes les pyrophosphatases.

5° La Vitamine C. — Nous avons terminé l'étude des effecteurs des pyrophosphatases, en examinant l'action de l'acide ascorbique sur la pyrophosphatase alcaline (pH optimum 7,9).

Afin de pouvoir comparer les résultats de cette étude avec ceux que nous a donné l'examen de la phosphomonoestérase alcaline, nous avons opéré dans les mêmes conditions que pour cette diastase. L'hydrolyse a duré 2 heures et nous avons étudié à la fois l'action de l'acide ascorbique sur l'organe frais et sur la poudre acétonique. Les concentrations en acide ascorbique utilisées varient de 0 à 50 mg. pour 5 cm³ (correspondant à 0,5 cm³ de macération) :

TABLEAU LV

Acide ascorbique (mg. pour 5 cc.) ..	0	1	5	10	25	50
P % Produit frais	32	33	30	30	31	29
P % Produit acétonique	10	11	9	9	8	9

L'examen de ce tableau ne montre pas d'action bien nette de la vitamine C sur la pyrophosphatase alcaline aussi bien dans le produit frais que dans la poudre acétonique.

Enfin, l'action de l'acide ascorbique sur la même diastase fut examinée en présence et en l'absence de traces de cuivre. Les concentrations en acide ascorbique restent les mêmes et une série de tubes contient en plus 10 γ de cuivre. L'étude a porté sur la macération d'organe frais et l'hydrolyse a duré 2 heures :

TABLEAU LVI

Acide ascorbique (mg. pour 5 cc.) ..	0	1	5	10	25	50
P % Sans Cu	30	30	32	33	33	31
P % Avec 10 γ Cu	30	18	17	16	16	15

Les résultats concernant les milieux ne contenant pas de cuivre sont évidemment analogues à ceux du tableau précédent, mais l'addition du cuivre provoque une forte inhibition qui croît avec la concentration en vitamine C.

L'acide déhydroascorbique, formé par l'oxydation par le cuivre de la vitamine C, paraît être fortement inhibiteur de la pyrophosphatase alcaline, alors que l'acide ascorbique est sans action sur elle.

II. — LES PHOSPHODIESTÉRASES

Après avoir étudié en détail les systèmes phosphomonoestérasique et pyrophosphatasique, nous avons terminé ce travail par la recherche de quelques autres systèmes phosphatasiques moins importants.

Ce sont d'abord les phosphodiéstérases que nous avons cherché à mettre en évidence dans la cortico et dans la médullo-surrénale. Nous avons examiné l'activité diestérasique des macérations d'organe frais, en opérant dans les mêmes conditions que pour les monoestérases et les pyrophosphatases. Le substrat utilisé fut le diméthyl phosphate de sodium (1), dont nous avons préparé une solution à 0,7 mg. de phosphore par cm³.

Connaissant l'extrême résistance des diesters à l'hydrolyse, nous avons utilisé des temps d'étuve longs. Ces temps furent de 48 heures pour la médullo-surrénale et de 72 heures pour

(1) Ce composé a été préparé de la manière suivante : on fait agir une molécule de P_2O_5 sur 4 molécules de CH_3OH en milieu étheré en agitant après chaque petite quantité de P_2O_5 ajoutée. Refroidir (faire l'opération dans un flacon sec bien bouché non émeri). Après avoir mis P_2O_5 , on laisse reposer pendant 3 heures, puis on neutralise avec une solution saturée de CO_2Ba . On traite par une solution concentrée de SO_4Na_2 , on filtre et on dose.

la cortico-surrénale. Les essais que nous avons réalisés nous ont donné les résultats suivants :

TABLEAU LVII

Cortico-surrénale (72 heures d'hydrolyse) :												
pH	2,1	3,6	4,5	5,2	5,8	6,6	7	7,6	8,3	8,6	9,3	10,1
P %	7	9	17	20	18	18	19	20	15	15	18	11
Médullo-surrénale (48 heures d'hydrolyse) :												
pH	3	4,3	5,1	5,5	5,8	6	6,9	7,5	8,2	8,9	9,3	10,1
P %	10	15	17	15	12	13	15	16	15	12	10	8

Examinons d'abord les résultats de la cortico-surrénale. L'étude de l'activité diestérasique de cet organe en fonction du pH nous montre trois maximums pour les valeurs de pH : 5,2, 7,6 et 9,3. Notons d'abord que les deux premières valeurs de pH ne correspondent à aucun optimum dans les courbes représentant l'activité monoestérasique de la cortico-surrénale. Seule la troisième valeur de pH : 9,3 correspond au pH optimum de la diastase A_1 . Cet optimum est donc assez douteux car il est possible que la monoestérase alcaline possède une légère action sur les diesters.

Par contre, les optimums à pH 5,2 et 7,6 sont très voisins de ceux que HOTTA (1) a observés en étudiant l'action diestérasique des extraits de rein.

Pour UDAGAWA (2), il y aurait dans les organes animaux une espèce de diestérase qui aurait son pH optimum à 9. Il n'est donc pas impossible que cette diastase existe dans la cortico-surrénale.

Si maintenant nous examinons les résultats qui nous sont fournis par l'étude de l'activité diestérasique de la médullo-surrénale en fonction du pH, nous remarquons deux maxi-

(1) HOTTA. — *J. Biochem. Japan*, 1934, 20, 343.

(2) UDAGAWA. — *J. Biochem. Japan*, 1935, 22, 2.

mums : l'un pour une valeur de $\text{pH} = 5,1$, l'autre pour le $\text{pH} 7,5$. Ces deux valeurs sont encore celles qui sont signalées par HOTTA dans les extraits de rein. Ici on ne retrouve plus de maximum à $\text{pH} 9$.

Il semble donc qu'il existe dans les macérations de cortico et de médullo-surrénales fraîches 2 types de phosphodiesterases, dont l'un a son pH optimum à $5,1-5,2$ et l'autre a son optimum à $\text{pH} 7,5-7,6$. Il y aurait peut-être même dans la cortico-surrénale un troisième type de diestérase ayant son pH optimum à 9.

III. — LES MÉTAPHOSPHATASES

Nous avons cherché à mettre en évidence des métaphosphatases dans les macérations de cortico- et de médullo-surrénales fraîches et dans celles de leur poudre acétonique. Le substrat utilisé était le métaphosphate de sodium. Nous avons étudié l'activité métaphosphatasique en fonction du pH . Des temps courts (2-3 heures) ne donnant aucun résultat, nous avons poursuivi l'hydrolyse 24 et 48 heures. On constate après ces temps longs une hydrolyse faible (10 %) et uniforme pour toute la gamme des pH .

IV. — LES PHYTINASES

L'action des macérations fraîches de cortico- et de médullo-surrénale sur la phytine fut enfin examinée. Nous avons opéré à des pH différents, nous avons employé des temps courts et des temps longs; et nous n'avons jamais observé d'hydrolyse. Il semble donc que les surrénales ne renferment pas de phytinases.

RÉSUMÉ

Les recherches que nous avons entreprises sur les systèmes phosphatasiques de la capsule surrénale nous ont permis d'aboutir aux résultats suivants :

Les phosphomonoestérases rencontrées dans la cortico- et dans la médullo-surrénale sont au nombre de deux : d'une part, la phosphatase très acide A_3 (pH optimum 3-4), d'autre part, la phosphatase alcaline A_1 (pH optimum 9) ; on les retrouve dans les macérations de produit frais et de poudre acétonique.

Dans les deux organes, la phosphomonoestérase A_1 possède une activité supérieure à celle de la diastase A_3 . En ce qui concerne la phosphatase A_1 , son activité se répartit d'une manière non uniforme dans les deux régions de la capsule surrénale. Le cortex est 7 fois plus actif si l'on compare des poids égaux des deux parties de l'organe, et si l'on tient compte des masses respectives de celles-ci la partie corticale devient 24 fois plus active que la médullaire.

Parmi les substances minérales et organiques dont nous avons étudié l'action sur les phosphomonoestérases de la cortico-surrénale, nous n'avons trouvé que trois activateurs de la diastase A_1 , à savoir le magnésium, le manganèse et l'adrénaline, le premier exerçant l'action la plus forte.

Toutes les substances étudiées inhibent la phosphatase A_3 , alors que seuls le zinc, le cuivre et l'acide cholique sont inhibiteurs de la phosphatase alcaline.

Nous avons retrouvé dans les deux parties de la capsule surrénale les trois pyrophosphatases des tissus animaux. Mais, alors que ces trois diastases sont mises en évidence d'emblée chez la médullo-surrénale, il a fallu l'action du magnésium pour faire apparaître la pyrophosphatase acide (pH optimum 5,2-5,5) dans les macérations de cortico-surrénale fraîche.

Nous avons constaté l'action inhibitrice du zinc sur les trois pyrophosphatases de la cortico-surrénale; avec le fluorure on ne remarque que l'inhibition des deux diastases acides; enfin, le magnésium inhibe seulement la pyrophosphatase très acide et active les deux autres.

Les macérations de cortico- et de médullo-surrénale fraîches paraissent renfermer deux phosphodiéstérases (pH optimum 5,2 et 7,6) et ne pas posséder de métaphosphatases ni de phytinases.

En ma qualité de Censeur de tour,

j'ai lu la thèse ayant pour titre

« Les systèmes phosphatasiques de la capsule surrénale »

par M. H. BESSOLES.

Je pense que la Faculté peut en permettre l'impression.

Montpellier, le 6 juin 1944.

Le Professeur,

A. ASTRUC.

Vu:

Montpellier, le 6 juin 1944.

Le Doyen,

A. ASTRUC.

Vu et permis d'imprimer :

Montpellier, le 7 juin 1944.

Le Recteur,

E. BOUSSAGOL.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
<i>Chapitre I.</i> — Notions générales sur les phosphatases ..	17
I. Classification	17
II. Extraction et purification	24
III. Constitution	26
IV. Les effecteurs	31
<i>Chapitre II.</i> — Techniques générales	39
Description de l'organe	39
Décortication	42
Broyage	43
Macération	43
Hydrolyse	44
Dosage de l'acide phosphorique libéré	46
<i>Chapitre III.</i> — Le système phosphomonoestérasique ..	49
I. — Etude de l'organe frais	49
A) Cortico-surrénale	51
1° 1 ^{er} liquide d'épuisement	52
2° 2° » »	55
3° 3° » »	56
4° 4° » »	58

B) Médullo-surrénale	58
1° 1 ^{er} liquide d'épuisement	59
2° 2 ^e »	61
3° 3 ^e »	62
II. — Etude de la poudre acétonique	64
A) Cortico-surrénale	65
B) Médullo-surrénale	67
Addendum : Les adsorptions	68
III. — Les vitesses de réaction de la phosphatase A ₁	69
A) Cortico-surrénale	71
B) Médullo-surrénale	72
IV. — Les effecteurs	76
A) Les cathions	76
1° Le magnésium : détermination du q Mg optimum	76
2° Le manganèse	77
3° Le zinc	79
4° Le cuivre	80
B) Les anions	80
1° Le fluorure	80
2° L'oxalate	82
3° Le cyanure	82
C) Les substances organiques	83
1° La vitamine C	83
2° Le cholestérol	85
3° L'acide cholique	86
4° L'adrénaline	87
5° La désoxycorticostérone	88
Chapitre IV. — Les autres systèmes phosphatasiques ..	91
I. — Les pyrophosphatases	91

A) Cortico-surrénale	92
1° produit frais	92
2° poudre acétonique	93
B) Médullo-surrénale	93
1° produit frais	93
2° poudre acétonique	94
C) Les effecteurs	95
1° Le magnésium	95
a) cortico-surrénale	95
b) médullo-surrénale	97
2° Le zinc	96
3° Le fluorure	98
4° Le cyanure	99
5° La vitamine C	100
II. — Les phosphodiesterases	101
III. — Les métaphosphatases	103
IV. — Les phytinases	103
Résumé	105

ACHEVE D'IMPRIMER

LE 7 NOVEMBRE 1946

SUR LES PRESSES DE J. PEYRONNET et Cie

IMPRIMEURS-EDITEURS

33, RUE VIVIENNE, PARIS-2°

Ateliers de Joigny (Yonne)

C. O. L. 31.0086

Dépôt légal : 4° Trimestre 1946

